

# **Biochemie des anaeroben Toluol- Stoffwechsels von *Thauera aromatica***

Von dem Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Carmen Feil

aus Spaichingen

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Heider

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Pfeifer

Tag der Einreichung: 28.02.06

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04.06

Darmstadt 2006

D17

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>1. Verwendete Organismen und Materialien</b>	<b>12</b>
<b>2. Chemikalien, Biochemikalien und Gase</b>	<b>13</b>
<b>3. Bakterienzüchtung und Herstellung von Zellextrakten</b>	<b>13</b>
3.1 Medien und Nährböden	13
3.2 Zellanzuchten	15
3.3 Herstellung von Zellextrakten	16
<b>4. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>17</b>
4.1 Polymerase-Kettenreaktion	17
4.2 Restriktion	18
4.3 Ligation	19
4.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	19
4.5 Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	19
4.6 Isolierung von Plasmid-DNA	20
4.7 Isolierung chromosomaler DNA	20
<b>5. Enzymatische Tests</b>	<b>21</b>
5.1 Enzymtest zur Bestimmung der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Aktivität	21
5.2 Enzymtest zur Bestimmung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase-Aktivität	21
5.3 Enzymtest zur Bestimmung der ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase-Aktivität mit Strep- Tag	22
<b>6. Reingung von Enzymen</b>	<b>23</b>
6.1 Reinigung der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	24
6.2 Reingung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase	25
6.3 Reinigung der ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag	25
6.4 Reinigung des aktivierenden Enzyms mit His-Tag	26

<b>7. Chemische Arbeitsmethoden</b>	<b>27</b>
7.1 Synthese von ( <i>E</i> )-Phenylitaconat	27
7.2 Synthese von ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA	29
<b>8. Elektrophoretische und immunologische Methoden</b>	<b>29</b>
8.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	29
8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
8.3 Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen	32
8.4 Immunologischer Nachweis („Western Blot“)	33
<b>9. Analytische Methoden</b>	<b>34</b>
9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	34
9.2 Proteinbestimmung	35
9.3 N-terminale Sequenzierung von Proteinen	36
<b>10. Spektroskopische Methoden</b>	<b>36</b>
10.1 UV/Vis-Spektroskopie	36
10.2 Massenspektroskopische Untersuchungen	36
10.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	37
<b>11. Proteinkristallisation</b>	<b>38</b>
11.1 Probenvorbereitung	38
11.2 „sitting drop“-Technik	38
11.3 Ölkristallisation	38
11.4 Kristallisation von ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag	39
11.5 Einfrieren der Kristalle der ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag	39
11.6 Röntgenstrukturanalyse	39
<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>1. Untersuchungen zur <math>\beta</math>-Oxidation von (<i>R</i>)-Benzylsuccinat</b>	<b>40</b>
1.1 Reinigung und Charakterisierung der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	41
1.1.1 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	41
1.1.2 Chemische Synthese von ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA	42
1.1.3 Reinigung der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	43
1.1.4 Untersuchung des Produkts der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Reaktion	48
1.1.5 Biochemische Charakterisierung der ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	50
1.1.6 Produktion von Antikörpern gegen die ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	52

1.2 Reinigung und Charakterisierung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase	53
<b>2. Untersuchungen an der (R)-Benzylsuccinat-Synthase</b>	<b>56</b>
2.1 Klonierung	56
2.2 Reinigung über Affinitätschromatographie	56
2.3 UV/Vis-Spektrometrie und Elementaranalyse der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	57
2.4 Elektronenspinresonanz (ESR)-Analyse der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	58
2.4.1 Temperaturabhängigkeit	59
2.4.2 Sättigungsverhalten der ESR-Spektren bei Steigerung der Mikrowellen-Leistung	60
2.4.3 Spinquantifizierung	61
2.4.4 Einfluss von Inhibitoren auf das ESR-Spektrum der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	62
2.4.5 Einfluss von NO auf das ESR-Spektrum der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	65
2.5 Kristallisierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase	66
2.5.1 Aerobe Kristallisationsansätze	66
2.5.2 Anaerobe Kristallisationsansätze	66
2.5.3 Röntgenstrukturanalyse	68
2.6 Das aktivierende Enzym	69
2.6.1 Klonierung des aktivierenden Enzyms	69
2.6.2 Reinigung des aktivierenden Enzyms durch Affinitätschromatographie	70
2.6.3 UV/Vis-Spektrum des aktivierenden Enzyms	71
2.6.4 Rekonstitution der Fe-S-Cluster	71
2.7 Enzymtest zum Nachweis der Aktivierung von (R)-Benzylsuccinat-Synthase durch das aktivierende Enzym	72

<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
1. ( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA Hydratase	77
2. (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase	80
3. ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase	82
4. Aktivierendes Enzym	90
5. Aktivierung der ( <i>R</i> )-Benzylsuccinat-Synthase	91
 <b>Abkürzungsverzeichnis</b>	 <b>92</b>
 <b>Literaturverzeichnis</b>	 <b>93</b>

## Biochemistry of anaerobic toluene metabolism of *Thauera aromatica*

Toluene is degraded under anaerobic conditions by the denitrifying  $\beta$ -proteobacterium *Thauera aromatica*. The initial reaction of the anaerobic catabolism of toluene is the addition of the methyl group of toluene on the double bond of fumarate. This first step is catalysed by the enzyme (*R*)-benzylsuccinate synthase and yields (*R*)-benzylsuccinate. This enzyme belongs to the family of glycyl radical enzymes. Similar to other members of this enzyme family an activating enzyme introduces the radical posttranslationally into benzylsuccinate synthase. Benzylsuccinate synthase is only active in this radical-containing form.

(*R*)-Benzylsuccinate is oxidised by a  $\beta$ -oxidation pathway to benzoyl-CoA which is a central intermediate of anaerobic aromatic metabolism. Its further degradation is well understood.

One topic of this work was the characterisation of benzylsuccinate synthase and its activating enzyme by spectroscopic, structural and biochemical investigations. A second topic was the characterisation of enzymes of the  $\beta$ -oxidation of benzylsuccinate which had not been investigated prior to the work.

- (1) Until now, enzyme activity of benzylsuccinate synthase was only detected in crude extract of *T. aromatica*. In this work it was shown for the first time that purified benzylsuccinate synthase is activated by the activating enzyme *in vitro*. Two [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-clusters were identified as additional cofactors by UV/Vis- and EPR-spectroscopy. EPR-studies of benzylsuccinate synthase treated with CO, NO and cyanide revealed that the detected [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]-clusters are involved in enzyme mechanism. Conditions were found under which purified recombinant benzylsuccinate synthase formed crystals. They diffracted in X-ray crystallographic analysis to about 8 Å. Till now the activity of the activating enzyme was only detected in crude extract of *T. aromatica*. In this work, the enzyme was overproduced for the first time in a soluble and functional active form in *E. coli*.
- (2) (*E*)-Phenylitaconal-CoA is an intermediate of the  $\beta$ -oxidation of (*R*)-benzylsuccinate. It is converted by (*E*)-phenylitaconyl-CoA hydratase to (hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA. The enzyme was overproduced heterologously in *E. coli*, purified and characterised. The composition of the enzyme was identified as

a homotetramer composed of subunits of 28 kDa. The  $K_m$ -value of (*E*)-phenylitaconyl-CoA was to  $104 \pm 34 \mu\text{M}$ , and the specific activity of the enzyme to  $52 \mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg}^{-1} \text{protein}]$  determined.

- (3) The next step of the pathway is catalysed by (hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA dehydrogenase, which oxidises (hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA to benzoyl-CoA. The enzyme was purified and the substrate-dependent reduction of NAD was shown in a coupled enzyme test with (*E*)-phenylitaconyl-CoA hydratase.

## Zusammenfassung

Toluol wird unter anaeroben Bedingungen durch das denitrifizierende  $\beta$ -Proteobakterium *Thauera aromatica* abgebaut. Die initiale Reaktion des anaeroben Toluol-Stoffwechsels ist die Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat. Dieser Schritt, bei dem (*R*)-Benzylsuccinat entsteht, wird durch das Enzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert. Dieses Enzym gehört zur Familie der Glycylradikalenzyme und wird erst posttranslational durch ein aktivierendes Enzym zur aktiven, Radikal-haltigen Form umgesetzt. (*R*)-Benzylsuccinat wird dann über  $\beta$ -Oxidation weiter zu Benzoyl-CoA umgesetzt, einem zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels, dessen weiterer Abbauweg bereits gut bekannt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, durch spektroskopische, strukturelle und biochemische Studien die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase und das aktivierende Enzym zu charakterisieren. Ein weiteres Ziel bestand in der Charakterisierung der noch nicht untersuchten Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat.

- (1) Die Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde bis jetzt nur im Rohextrakt von *Thauera aromatica* nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass gereinigte rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase *in vitro* durch das aktivierende Enzym aktiviert wird. Durch UV/Vis- und ESR-Spektroskopie wurden außerdem zwei  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren als zusätzliche Kofaktoren der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase identifiziert. Durch ESR-Analysen nach Behandlung des Enzyms mit den Inhibitoren CO, NO und Cyanid wurde der Nachweis erbracht, dass diese Fe-S-Zentren am Mechanismus des Enzyms beteiligt sind. Es wurden Bedingungen gefunden, unter denen gereinigte rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase Kristalle bildete, die für eine Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden konnten und bereits bis zu einer Auflösung von 8,0 Å streuten. Das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase war in aktiver Form bis jetzt nur im Rohextrakt von *Thauera aromatica* nachzuweisen. Mit dieser Arbeit wurde es zum ersten Mal in löslicher und funktionell aktiver Form in *E. coli* überproduziert.



- 
- (2) (*E*)-Phenylitaconyl-CoA ist ein Intermediat der  $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat und wird durch eine (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA umgesetzt. Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* überproduziert, gereinigt und charakterisiert. Es handelt sich dabei um ein Homotetramer aus 28 kDa-Untereinheiten. Der  $K_m$ -Wert für (*E*)-Phenylitaconyl-CoA liegt bei  $104 \pm 34 \mu\text{M}$ , die spezifische Aktivität bei  $52 \mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg}^{-1} \text{ Protein}]$ .
- (3) Die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase oxidiert (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA zu Benzoylsuccinyl-CoA. In einem gekoppelten Enzymtest wurde die Enzym-abhängige NAD-Reduktion gezeigt.

## **EINLEITUNG**

Aromatische Verbindungen sind zyklische Kohlenwasserstoffverbindungen mit einer besonderen Elektronenkonfiguration. Sie sind häufig in unserer natürlichen Umgebung anzutreffen. Die mengenmäßig größten Vorkommen in der Natur findet man in der Pflanzenwelt. So ist zum Beispiel Holz hauptsächlich aus Aromaten aufgebaut. Blüten- und Fruchtfarbstoffe gehören ebenfalls oft zu dieser Substanzklasse. Erdöl und Kohle bestehen auch zum Grossteil aus Aromaten und aromatische Aminosäuren sind in allen Organismen zu finden. Außerhalb der natürlichen Vorkommen spielen aromatische Verbindungen heute eine bedeutende Rolle in der chemischen Industrie. Aromatische Kohlenwasserstoffe werden als organische Lösungsmittel eingesetzt und sind Ausgangsstoffe für die Synthese von verschiedensten Produkten.

Die aromatischen Kohlenwasserstoffe mit der größten technischen Bedeutung in der Industrie werden in der sogenannten BTEX-Gruppe zusammengefasst, wobei die Abkürzung BTEX für die Substanzen Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol steht. Diese Stoffe werden aus Erdöl oder Steinkohle gewonnen und dienen bei vielen industriellen Verfahren als Lösungsmittel. Außerdem sind sie Ausgangsprodukte für die Herstellung vieler chemischer Produkte wie zum Beispiel Arzneimittel, Agrochemikalien und Plastik. BTEX-Substanzen können aber auch in anoxischen Umgebungen auf natürliche Weise entstehen. Zum Beispiel wird unter Sauerstoffausschluss aus Ligninverbindungen Toluol gebildet (Vogel und Grbic-Galic, 1986). Es entsteht auch durch einige gram-positive Clostridien und das fakultativ anaerobe Bakterium *Tolomonas auensis* nach Decarboxylierung von Phenylacetat (Jüttner *et al.* 1986;). BTEX –Stoffe schädigen nicht nur die Umwelt, sondern wirken auch toxisch auf den menschlichen Organismus. Die Aromaten werden über die Haut und Atemwege aufgenommen und durch ihren lipophilen Charakter im Fettgewebe angereichert. Sie schädigen das zentrale Nervensystem und die Blutbildung. Benzol ist außerdem krebserregend. BTEX-Substanzen wurden vom U.S. Public Health Service als umweltverschmutzende Chemikalien eingestuft. Die EU förderte bis vor kurzem in einem Projekt namens AMICO („Adaption of microbial communities to organic contaminants in oligotrophic aquifers“; EU Projektnummer: QLK3-2000-00731) verschiedene Forschungsgruppen, um Strategien zu entwickeln, um BTEX-Schadstoffe im Erdreich biologisch abzubauen. Es geht in diesem Projekt um eine industrielle Fläche in der Tschechischen Republik, die stark mit Benzol und den anderen BTEX-Schadstoffen

kontaminiert ist. Ziel ist es, die im Boden bereits vorhandenen Mikroorganismen, die BTEX abbauen können, zu stimulieren und somit das Erdreich zu säubern.

Toluol gehört wie oben erwähnt zur BTEX-Gruppe. Es wird hauptsächlich aus Erdöl gewonnen, fällt aber auch bei der Herstellung von Ethen und Propen an. Die jährliche Weltproduktion liegt bei 5.000.000- 10.000.000 Tonnen ([www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)).

Toluolemissionen werden in der Erdatmosphäre unter aeroben Bedingungen nach mehreren Tagen über Hydroxylradikale, die sich durch die UV-Strahlung bilden, abgebaut. Der größte Teil des freigesetzten Toluols stammt aus dem Kfz-Verkehr (65 %). Der restliche Anteil kommt fast ausschließlich aus dem Gebrauch von toluolhaltigen Produkten, und nur ein sehr kleiner Teil des Toluols wird bei der Herstellung freigesetzt.

Toluol wird als Lösungsmittel für Harze, Fette, Öle, Lacke, Kleb- und Farbstoffe benutzt und dient als Ausgangsstoff für die Synthese von Produkten aus den unterschiedlichsten Bereichen. So wird zum Beispiel der Sprengstoff TNT aus Toluol hergestellt. Aber auch in Lebensmittel enthaltene Substanzen werden zum Teil aus Toluol synthetisiert, wie zum Beispiel der Konservierungstoff Benzoesäure oder der Süßstoff Saccharin, der im Rehmsen-Fahlberg-Verfahren aus Toluol gewonnen wird (Merki, 1993). Toluol wird Benzin bis zu fünf Volumenprozent zugesetzt und erhöht dort die Oktanzahl und damit die Klopfestigkeit. Aus chemischer Sicht gehört Toluol neben den Alkanen zu den reaktionsträgsten organischen Verbindungen. Das liegt zum einen an dem sehr stabilen, delokalisierten Elektronensystem des aromatischen Rings und zum anderen daran, dass reaktionsfähige, funktionelle Gruppen fehlen.

Toluol ist gesundheitsschädlich, wirkt aber nicht erbgutverändernd wie Benzol. Das liegt vor allem daran, dass Toluol im menschlichen Körper hauptsächlich durch die Oxidation der Seitenkette zur Benzoesäure verstoffwechselt wird. Aus diesem Grund entsteht kaum karzinogenes Epoxid wie im Falle des Benzols. Toluol verursacht Nerven-, Nieren- und möglicherweise auch Leberschäden und ist fortpflanzungs- und fruchtschädigend.

Toluoldämpfe haben narkotisierende Wirkung und reizen Augen und Atmungsorgane, weshalb es an gut belüfteten Orten aufbewahrt werden sollte. Toluol ist selbst in geringen Mengen, obwohl es nur in sehr geringem Maß wasserlöslich ist, wassergefährdend.

### **Aerober mikrobieller Abbau von Toluol**

Gelangt Toluol in die Umwelt, so wird es unter aeroben Bedingungen von einer Reihe verschiedener Bakterien und Pilze als Energie- und Kohlenstoffquelle benutzt (Zylstra und Gibson, 1991; Gottschalk, 1998; Schlegel, 1992), vorausgesetzt es liegt in nicht-toxischen Konzentrationen vor. Sämtliche toluolabbauende Spezies verwenden dabei Mono- und Dioxygenasen (Dagley, 1984; Gibson *et al.*, 1984), um das reaktionsträge Toluol chemisch zu aktivieren und dadurch abbaubar zu machen. Dabei werden ein oder zwei Sauerstoffatome aus dem molekularen Sauerstoff der Luft in Form von Hydroxygruppen in das Substrat eingeführt. Der aromatische Ring wird dadurch leichter angreifbar, womit eine Ringspaltung und der weitere Abbau möglich ist. Die dazugehörigen Stoffwechselwege sind seit etwa 20 Jahren bekannt und gut untersucht (Harwood und Parales, 1996).

### **Anaerober mikrobieller Abbau von Toluol**

Vor etwa 20 Jahren wurde nachgewiesen, dass Toluol und einige andere Kohlenwasserstoffe auch in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff von Bakterien abgebaut werden, was in mehrfacher Hinsicht interessant ist.

Es gibt in unserer Umwelt anaerobe Bereiche, die mit Toluol kontaminiert werden wie zum Beispiel das Grundwasser oder tiefe Bodenschichten. Durch Mikroorganismen, die unter anaeroben Bedingungen Toluol verstoffwechseln, kann die Verunreinigung abgebaut werden. Des weiteren ist für die Ölindustrie der anaerobe Abbau von Toluol durch sulfatreduzierende Bakterien besonders interessant. Hierbei entsteht hochgiftiger Schwefelwasserstoff, der nicht nur eine Bedrohung der Arbeiter darstellt, sondern auch zur Korrosion von Pipelines und Erdöltanks führt.

Außerdem ist es auch höchst interessant zu erfahren, unter welchen natürlichen Bedingungen, der chemisch sehr stabile aromatische Ring ohne Verwendung von molekularem Sauerstoff aufgebrochen wird.

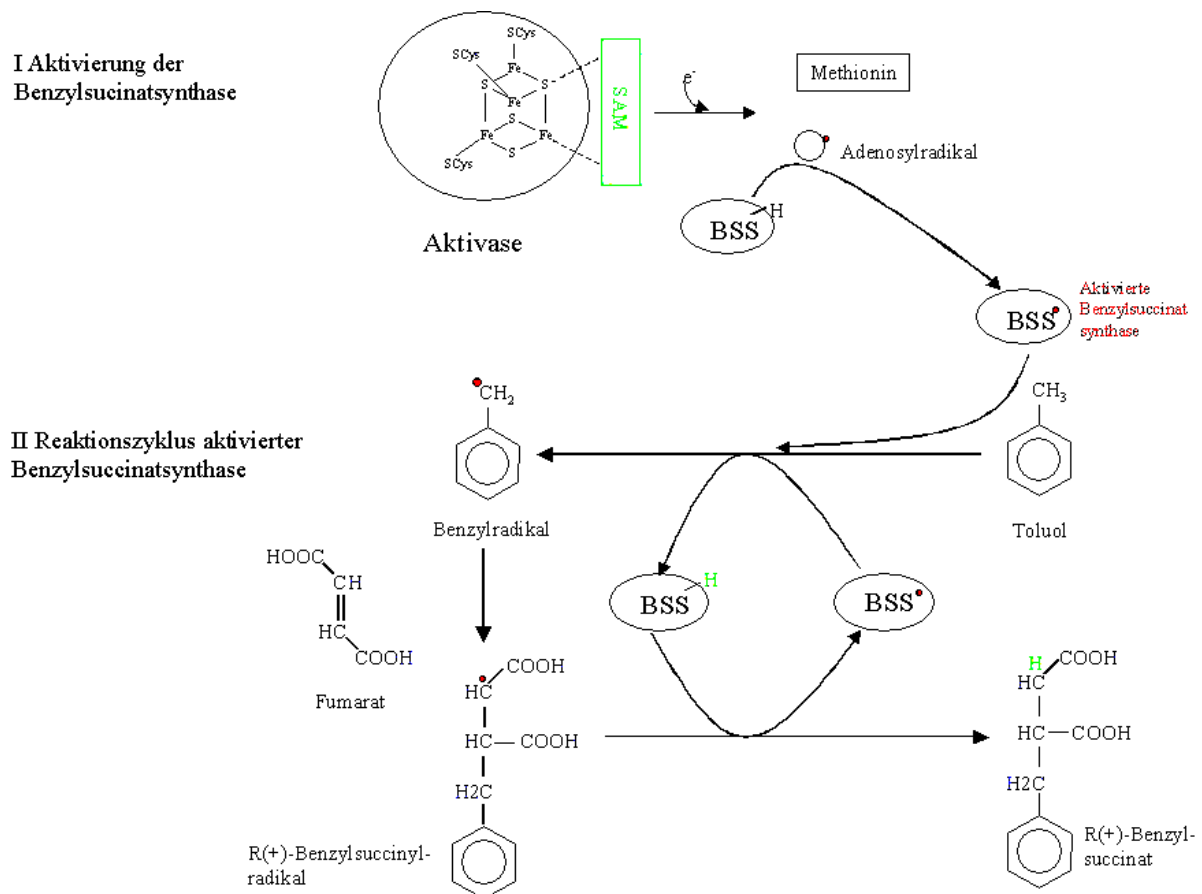
## Toluolabbauende Bakterien

Der anaerobe Abbau von Toluol durch Bakterien wurde vor etwa 20 Jahren nachgewiesen (Vogel und Grbic-Galic, 1986; Zeyer *et al.*, 1986). Inzwischen sind etliche toluolabbauende Bakteriengattungen bekannt, die phylogenetisch keiner einheitlichen Gruppe zugehören. Nach ihren Stoffwechsel-Typen werden sie in denitrifizierende, Eisen(III)-reduzierende, Sulfat-reduzierende, Protonen-reduzierende Bakterien und phototrophe Bakterien unterteilt. Die meisten isolierten Organismen bauen Toluol unter denitrifizierenden Bedingungen ab und gehören zu den  $\beta$ -Proteobakterien. Zu ihnen gehören die Gattungen *Thauera* und *Azoarcus*, die häufig in der Natur im Boden vorkommen. Bekannte Stämme dieser Gattungen, die in unserem Labor als Untersuchungsobjekt dienen, sind *T. aromatica* Stamm K172 (Anders *et al.*, 1995) und *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (früher *Azoarcus* sp.; Rabus und Widdel, 1995). Neben den nitratreduzierenden Gattungen sind Vertreter aus der Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien gefunden worden, die Sulfat (Beller *et al.*, 1996; Rabus und Widdel, 1995) oder Eisen(III) (Lovley und Lonergan, 1990) als terminalen Elektronenakzeptor verwenden. Die sulfatreduzierende Gattung *Desulfobacula* oxidiert zum Beispiel verschiedene aromatische Verbindungen zu CO<sub>2</sub>, einschließlich von Toluol. Ihr natürliches Habitat ist das Meerwasser. *Geobacter metallireducens* ist ein bekannter Vertreter der Eisen(III)-reduzierender Bakterien, der auch Toluol als Elektronendonator verwenden kann. Dies könnte für den Umweltschutz eine Rolle spielen, da häufig eisenreiche Gewässer mit Toluol verschmutzt sind und hier der Organismus zur Dekontamination eingesetzt werden könnte. *G. metallireducens* dient häufig als Untersuchungsobjekt und wird auch in unserem Labor verwendet. Außer den Toluol-abbauenden Bakteriengattungen, die ihre Energie über Elektronentransport und Atmung gewinnen, wurden Organismen gefunden, die Aromaten vergären können. Sie wachsen allerdings nur in Kokultur mit sulfatreduzierenden Bakterien oder methanogenen Archaea (Vogel und Grbic-Galic, 1986). Neben den genannten chemotrophen Organismen sind inzwischen auch phototrophe Bakterien entdeckt worden, die aromatische Verbindungen abbauen können. So bezieht ein Stamm der Gattung *Blastochloris* zum Beispiel seine Energie aus dem Sonnenlicht und verwendet Toluol als Kohlenstoffquelle (Zengler *et al.*, 1999).

## Stoffwechselweg des anaeroben Toluolabbaus: (R)-Benzylsuccinat-Synthase

Unter anaeroben Bedingungen wird der reaktive Sauerstoff durch eine Radikal-Reaktion ersetzt. Verschiedene Gruppen wiesen vor etwa 20 Jahren (R)-Benzylsuccinat im Überstand von auf Toluol gewachsenen Zellen nach, wobei zunächst angenommen wurde, dass es sich dabei um ein Sackgassenprodukt handelt (Evans *et al.*, 1992; Beller *et al.*, 1992; Seyfried *et al.*, 1994; Frazer *et al.*, 1993). Wenig später wurde die Bildung von (R)-Benzylsuccinat als erster Schritt des anaeroben Abbaus von Toluol in *T. aromatica* identifiziert (Biegert *et al.*, 1996). (R)-Benzylsuccinat wird durch die Addition der Methylgruppe des Toluols an die Doppelbindung eines Fumarat-Cosubstrats gebildet. Das Enzym, welches die Reaktion katalysiert wurde nach dem ersten Intermediat des Abbaufweges „(R)-Benzylsuccinat-Synthase“ genannt. Das Protein besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , wobei die  $\alpha$ -Untereinheit mit 98 kDa deutlich größer ist als die kleinen Untereinheiten mit 8,5 und 6,4 kDa. Aktivierte (R)-Benzylsuccinatsynthase zeigt außerdem ein für Glycylradikalanzyme charakteristisches Verhalten: durch Inkubation mit Luftsauerstoff wird die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit am Glycylradikal oxygenolytisch gespalten (Knappe *et al.*, 1984), wodurch eine um 4 kDa verkürzte  $\alpha'$ -Untereinheit entsteht. Da jeweils nur eine  $\alpha$ -Untereinheit pro Holoenzym aktiviert ist, erkennt man auf dem SDS-Gel eine für Glycylradikalanzyme typische Doppelbande (Wagner *et al.*, 1992). Die Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Untereinheit der (R)-Benzylsuccinatsynthase bestätigte die Zugehörigkeit zur Enzymfamilie der Glycylradikalanzyme, deren bekannteste Vertreter die Pyruvat-Formiat-Lyase und die anaerobe Ribonukleotidreduktase sind. Neuere Forschungsarbeiten haben die Familie erweitert durch eine *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase aus *Clostridium difficile* (Selmer und Andrei, 2001) und eine Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum* (O'Brien *et al.*, 2004), die mit 31 % Sequenzidentität die größte Homologie zur (R)-Benzylsuccinat-Synthase besitzt. Im Gegensatz zu den genannten Vertretern dieser Enzymfamilie, die mit Ausnahme der *p*-Hydroxyphenylacetatdecarboxylase alle aus nur einer Polypeptidkette bestehen, besitzt die (R)-Benzylsuccinat-Synthase zwei kleine Untereinheiten mit noch unbekannter Funktion. Interessanterweise finden sich auf diesen Untereinheiten konservierte Cysteine, die für die Koordination der Eisenschwefelcluster zuständig sein könnten. Wie die anderen Glycylradikalanzyme benötigt auch die (R)-Benzylsuccinat-Synthase ein aktivierendes Enzym, das das Radikal posttranslational in die  $\alpha$ -Polypeptidkette einführt und damit das Enzym aktiviert (Abb. 1). Das aktivierende Enzym der (R)-Benzylsuccinat-Synthase zeigt starke Sequenzähnlichkeit zu den aktivierenden Enzymen der Pyruvat-Formiat-Lyase und der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase. In allen Enzymen ist ein

Cystein-Motiv stark konserviert, das einen unüblichen  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster bindet. Dabei bindet die vierte Koordinationsstelle kein Eisenatom, sondern das Cosubstrat S-Adenosylmethionin (SAM). Sämtliche bislang bekannten Glycylradikalenzyme benötigen für ihre Aktivierung SAM, wobei SAM hier nicht als Methylgruppendonor dient, sondern die Bildung des Glycylradikals initiiert.



**Abb. 1: Modell der Aktivierung und Reaktion der Benzylsuccinat-Synthase**

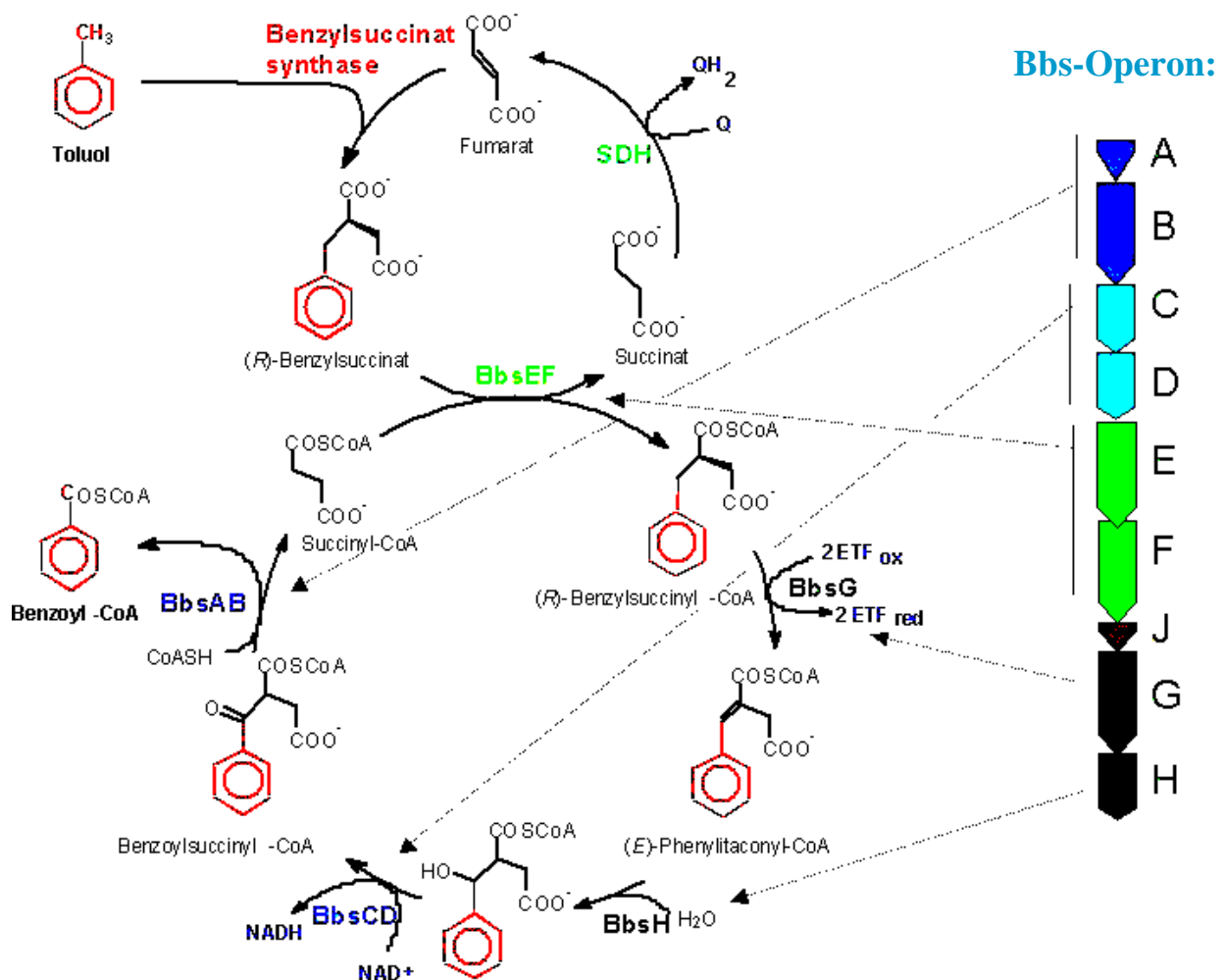
**I** Aktivierung: Bildung eines Adenosylradikals aus S-Adenosylmethionin durch das aktivierende Enzym.

**II** Reaktionszyklus der aktivierten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase: das radikalische Reaktionszentrum aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase abstrahiert ein Wasserstoffatom der Methylgruppe des Toluols, wodurch ein Benzylradikal gebildet wird. Das abstrahierte Wasserstoffatom bleibt im aktiven Zentrum gebunden. Das Benzylradikal reagiert mit einem Fumaratmolekül, wobei ein *R*(+)-Benzylsuccinylradikal entsteht, welches den Wasserstoff aus dem aktiven Zentrum re-abstrahiert. Dadurch entsteht zum einen das Produkt (*R*)-Benzylsuccinat und zum anderen wird der radikalische Ausgangszustand des Enzyms wiederhergestellt.

## Stoffwechselweg des anaeroben Toluolabbaus: $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat

Nach der initialen Reaktion der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase schließt sich eine  $\beta$ -oxidationsähnliche Kaskade von Enzymen an, die die Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA katalysieren (Abb. 2). Sämtliche Gene, die für diese Proteine kodieren befinden sich im sogenannten bbs-Operon („ $\beta$ -oxidation of benzylsuccinate“). (*R*)-Benzylsuccinat wird in einem ersten Schritt durch eine CoA-Transferase zu (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA aktiviert (Leutwein und Heider, 2001). Der CoA-Thioester wird durch eine flavinhaltige Dehydrogenase oxidiert (Leutwein und Heider, 2002), wobei (*E*)-Phenylitaconyl-CoA entsteht. Die Elektronen werden dabei vermutlich auf ein „Elektronen transferierendes Flavoprotein“ („electron-transferring flavoprotein“; ETF) übertragen, wie es von anderen Acyl-CoA Dehydrogenasen bekannt ist. Die drei weiteren enzymatischen Schritte bis zum Intermediat Benzoyl-CoA wurden noch nicht biochemisch nachgewiesen, jedoch sind im bbs-Operon offene Leserahmen identifiziert worden, die große Sequenzhomologien zu Enoyl-CoA-Hydratasen, Alkoholdehydrogenasen und Ketothiolasen aufweisen. Die nächsten Reaktionsschritte wurden deshalb in Analogie zur bekannten  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren postuliert. Zunächst findet vermutlich eine Hydratisierung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA statt, das durch eine Dehydrogenase oxidiert wird zu Benzoylsuccinyl-CoA. Benzoylsuccinyl-CoA wird dann in einem letzten Schritt durch eine Ketothiolase thiolytisch gespalten, wobei Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA entsteht. Benzoyl-CoA ist ein bekanntes Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels. Der weitere Abbau wird durch die Benzoyl-CoA-Reduktase eingeleitet (Boll und Fuchs, 1995) und auch die darauf folgenden Reaktionen bis hin zum Acetyl-CoA sind bereits gut untersucht (Lengeler, Drews und Schlegel, 1999). Das ebenfalls im letzten Schritt entstandene Succinyl-CoA wird durch die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert und steht damit der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase als Cosubstrat wieder zur Verfügung.





**Abb. 2: Übersicht über den Biziylus des anaeroben Toluolabbaus.**

**SDH**-Succinat-Dehydrogenase. **BbsEF**-(R)-Benzylsuccinat:Succinyl-CoA-Transferase.

**BbsG**-(R)-Benzylsuccinyl-CoA-Dehydrogenase. **BbsH**-(E)-Phenyllitaconyl-CoA-Hydratase. **BbsCD**-(Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA-Dehydrogenase. **BbsAB**-Ketothiolase.

## Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch biochemische, spektroskopische und strukturelle Untersuchungen den anaeroben Abbau von Toluol durch das denitrifizierende Bakterium *T. aromatica* K172 weiter aufzuklären. Der Schwerpunkt lag dabei auf der näheren Charakterisierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase. Zu Beginn der Arbeit wurde das Enzym als Fusionsprotein mit einem Strep-Tag überproduziert und mit Hilfe einer Affinitätsäule gereinigt. Damit führte ich Kristallisierungsversuche durch, um die Struktur des Enzyms

mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen. Außerdem wurde das gereinigte, nicht aktivierte Enzym mittels EPR-Spektroskopie untersucht, um die Eisenschwefelcluster und den Einfluss von Inhibitoren auf diese Zentren zu analysieren. Wichtigster Punkt war aber der Nachweis der Aktivierbarkeit der gereinigten Strep-getaggtten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch das aktivierende Enzym.

Ein zweiter Schwerpunkt war die Reinigung und Charakterisierung noch nicht beschriebener Enzyme, die an der  $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat beteiligt sind. Dabei wurden auch die weiteren Intermediate des Toluolstoffwechsels nachgewiesen und untersucht.

## MATERIAL UND METHODEN

### 1. Verwendete Organismen und Materialien

**Organismen und Vektoren.** Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 und die eingesetzten Primer in Tabelle 3 aufgeführt:

**Tabelle 1:** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Thauera aromatica</i> Stamm K172	Wildtyp (DSM-Nr.6984)	Tschech und Fuchs (1987)
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	<i>E.coli</i> B ; <i>F<sup>hdsS gal</sup> λ DE3</i>	Studier und Moffat (1986)
<i>E.coli</i> DH5α	<i>F-(φ80dΔ(lacZ)M15) recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE 44relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Woodcook (1989)

**Tabelle 2:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Erstbeschreibung/Herkunft
pPCR-Script Amp	amp <sup>r</sup>	Stratagene
pBBS-Strep (Derivat von pCR-Script Amp)	amp <sup>r</sup>	Stratagene
pBAD/D-TOPO	amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pTrc99A	amp <sup>r</sup>	Amann, 1988

**Tabelle 3:** Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz
GeobacterStrepBSS1	TCC GCA GGA GCT CAA CCA TGC AC
GeobacterStrepBSS2	CGA CAT ATG CTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCACAT GAA TAA CCC CCT GTT TG
GeobacterBssAB2	GCC GGA TCC AGT ATC ACA CAT GTT CTC
GeobacterBssAB1	GCG CAT ATG TCA ACG GTT GCT GCA TC

## 2. Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Sämtliche Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen. Die Biochemikalien wurden bei Roche Diagnostics (Mannheim), Gerbu (Gaiberg) und Merlin (Bornheim) gekauft. Die verwendeten Gase Stickstoff (99,999 %) und Formiergas (95 % Stickstoff, 5 % Wasserstoff) wurden von den Sauerstoffwerken Friedrichshafen geliefert.

Immunochemikalien wurden von GE (Amersham-Pharmacia; Freiburg) bezogen. Das Kaninchenantiserum gegen die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde von der Firma Bioscience (Göttingen) hergestellt.

## 3. Bakterienzüchtung und Herstellung von Zellextrakten

### 3.1 Medien und Nährböden

#### 3.1.1 Medium für die aerobe Anzucht von *E.coli*:

LB (Luria-Bertani)-Medium (Miller, 1972)

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1,0 % (w/v) NaCl

pH 7,5

#### 3.1.2 Medium für die aerobe Anzucht von *E.coli*:

TGYEP-Medium (Begg, 1977):

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

Nach dem Autoklavieren wurde mit folgenden sterilen Lösungen komplementiert:

0,4 % (w/v) Glucose (sterilfiltriert)

100 mM K-Phosphat-Puffer (pH 6,5)

**3.1.3 Medium für die Anzucht von *T. aromatica*:**Basalmedium:

32 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5

12 mM NH<sub>4</sub>Cl

1,3 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Spurenelemente SL10, x 5000 (Widdel,1983):

50 ml/l HCl (25 %)

7500 mg/l FeCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O

350 mg/l ZnCl<sub>2</sub>

500 mg/l MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O

30 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>

950 mg/l CoCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O

10 mg/l CuCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O

120 mg/l NiCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O

180 mg/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O

**3.1.4 Feste Nährböden:**LB-Agarplatten:

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1,0 % (w/v) NaCl

1,5 % Agar-Agar

LAXI-Platten (LB-Ampicillin-X-Gal-IPTG):

(Platten zur sog. „Blau-Weiss-Selektionierung“, siehe Lehrbücher der Genetik)

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1,0 % (w/v) NaCl

1,5 % Agar-Agar

100 µg/ml Ampicillin

1 mM IPTG

40 µg/ml X-Gal

### 3.2 Zellanzuchten

#### 3.2.1 Anzucht von *T. aromatica*

*T. aromatica* wurde unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen auf Toluol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in Mineralsalzmedium angezogen. Die Anfangskonzentration von Toluol betrug 2 mM, von Nitrat als einzigem Elektronenakzeptor 4 mM. Toluol ist für die Zellen ab einer Konzentration von 1-2 mM toxisch. Deshalb wurden die Kulturen mit 2 % (v/v) Paraffin als organischer Trägerphase überschichtet, in der der Großteil der Kohlenwasserstoffe gelöst ist. Die Kulturen wurden bei 30 °C geschüttelt. Das Animpfen erfolgte mit 1% (v/v) einer wachsenden Bakterienkultur.

#### 3.2.2 Anzucht von *E. coli*

**Aerobe *E.coli*-Kulturen.** Flüssigkulturen von *E.coli* wurden in LB-Medium (Miller, 1972) in zu 10-20 % (v/v) gefüllten Erlenmeyerkolben angezogen. Bei Bedarf wurde Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 37 °C geschüttelt. Die Induktion der Überproduktion von Proteinen erfolgte durch die Zugabe von 0,5-1 mM IPTG bei einer OD<sub>578</sub> von 0,3-0,5. Die Anzucht auf LB-Agar-Platten erfolgte in Brutschränken (Heraeus Instruments, Stuttgart) bei 37 °C über Nacht.

**Anaerobe *E.coli*-Kulturen.** Flüssigkulturen von *E.coli* wurden in 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 und 0,4 % (w/v) Maltose in randvoll gefüllten 1 l-Schottflaschen angezogen. Die Bakterien verbrauchen den im Medium gelösten Sauerstoff, wodurch der gesamte Ansatz anaerob wird. Der Einsatz von Antibiotika sowie die Durchführung der Überexpression erfolgte wie bei den aeroben Kulturen.

**Stammkulturen von *E.coli*.** *E.coli*-Zellen wurden auf LB-Agar bei Bedarf mit Antibiotikum versetzt ausgestrichen. Die Platten wurden ca. 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nalgene, Wiesbaden) überführt und mit 5 % (v/v) DMSO versetzt. Die Zellen wurden bei – 80 °C gelagert.

### 3.3 Herstellung von Zellextrakten

Frisch geerntete oder gefrorene Zellen wurden in einem bis zwei Volumen (w/v) Grundpuffer (10 mM Triethanolamin/NaOH pH 8,0) mit einer Spatelspitze DNase I aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French-Press-Zelle (American Instruments Company, Maryland, USA) bei einem Druck von 137 MPa. Der Extrakt wurde 60 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge L-60, 70 Ti-Festwinkelrotor, München). Der Überstand wurde entweder sofort weiter verwendet oder nach Zugabe von 10 % Glycerin (v/v) bei – 80 °C gelagert.

Bei Zellaufschlüssen unter strikt anaeroben Bedingungen wurden die Zellen im Anaerobenzelt in anaerobisiertem Grundpuffer mit DNase aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden im Anaerobenzelt in die French-Press-Zelle überführt. Der Zellaufschluß erfolgte wie oben bereits beschrieben, wobei der aufgeschlossene Extrakt mit Hilfe einer Kanüle direkt in eine anaerobisierte Anzuchtflasche geleitet wurde, die mit einem Gummistopfen verschlossen war. Der Zellextrakt wurde im Anaerobenzelt in Ultrazentrifugenbecher aus Polycarbonat überführt, die vor Verwendung mindestens 12 h im Anaerobenzelt gelagert waren. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Zentrifugenbecher wieder in das Anaerobenzelt eingeschleust, wo der Überstand abgenommen wurde. Er wurde entweder direkt verwendet oder in luftdicht verschließbaren Gefäßen mit 10 % Glycerin (v/v) bei – 80 °C gelagert.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden amplifiziert, indem Polymerase-Kettenreaktionen in 25 oder 100 µl Ansätzen in einem Thermocycler durchgeführt wurden. Die Methode wurde eingesetzt zur Vervielfältigung von Genen und DNA-Fragmenten und zur Kontrolle von Klonen.

Für die Amplifikation von Fragmenten, deren erwartete Größe kleiner als 2000 bp war, wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

H <sub>2</sub> O	14,25 µl
10 x PCR-Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP-Mix (2 nmol/µl)	2,5 µl
Primer 1 (2 pmol/µl)	2,5 µl
Primer 2 (2 pmol/µl)	2,5 µl
Chromosomale DNA	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
Volumen des Gesamtansatzes :	25 µl


Bei Reaktionsansätzen mit 100 µl Gesamtvolumen wurden die oben aufgeführten Mengen entsprechend erhöht.

Für die Amplifikation größerer DNA-Fragmente wurde ein Gemisch der Polymerasen Taq und Pfu (20:1) eingesetzt und die Primerkonzentrationen verdoppelt. Die Pfu-Polymerase besitzt gegenüber der Taq-Polymerase eine Exonuklease-Aktivität, wodurch sie Nukleotide mit geringerer Fehlerrate einbaut bzw. „falsch“ gepaarte Nukleotide wieder entfernen kann.

Bei der Durchführung einer sogenannten „colony-PCR“ wurde an Stelle der chromosomalen DNA eine Bakterienkolonie dem Ansatz zugegeben. Eine „colony-PCR“ eignet sich zur schnellen Überprüfungen der Bakterienklone, die nach einer DNA-Transformation Wachstum zeigen. Die Experimente wurden in 100 µl- bzw. 500 µl-PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt (Eppendorf, Hamburg).



Für DNA-Fragmente bis zu einer Grösse von 2000 bp wurde folgendes Standardprogramm mit variierenden Hybridisierungstemperaturen verwendet:

95 °C	5 min	
95 °C(Denaturierung)	30 sek	 35 Zyklen
50-54,8 °C(variierende Hybridisierungstemperatur)	45 sek	
72 °C(DNA-Polymerisation)	30-105 sek	
50 °C	30 sek	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Die Hybridisierungstemperatur wurde zunächst mit Hilfe des Programmes DNA-man errechnet und anschließend experimentell erprobt und bei Bedarf optimiert. Die gewählte Elongationszeit wurde abhängig von der Länge des erwarteten Fragmentes gewählt. Pro erwarteter kB wurde eine Minute berechnet.

Nach Beendigung der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes zur Kontrolle auf einem Agarosegel analysiert. Die Isolierung der PCR-Produkte erfolgte entweder durch Gelelution. Oder der Ansatz wurde ohne weiter Aufreinigung weiterverwendet, da vermutet wurde, dass die Agarose nicht komplett aus dem System entfernt werden kann und weitere Schritte beeinträchtigen könnte.

## 4.2 Restriktion

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte gemäss den Angaben der entsprechenden Hersteller. Plasmid-DNA wurde in der Regel 1 h behandelt. Die Restriktion wurde entweder durch Hitzeinaktivierung des Enzyms oder durch Umpuffern beendet. Restriktionen mit zwei verschiedenen Enzymen wurden soweit möglich im selben Puffer gleichzeitig durchgeführt. Wenn dies nicht möglich war, wurden die Restriktionsansätze mit dem „Wizard DNA Purification System“ umgepuffert.

### 4.3 Ligation

Plasmid-DNA und Insert-DNA wurden in 20  $\mu\text{l}$ -Ansätzen mit T4-DNA-Ligase (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ; MBI Fermentas) 4-5 h bei Raumtemperatur in Gegenwart von 1 mM ATP inkubiert. Bei der Ligation der drei Fragmente zur Klonierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag aus *Geobacter metallireducens* wurden die beiden Inserts und der Vektor in einem molaren Verhältnis von 5:1:1 eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden direkt zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen verwendet.

### 4.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Eine 5 ml Übernachtskultur wurde mit einer Einzelkolonie des betreffenden *E.coli* Stammes beimpft. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Morgen 250 ml LB-Medium angeimpft. Nach Erreichen einer OD von 0,5-0,7 bei 578 nm wurden die Zellen 15 min bei 4 °C und 4500 rpm (GSA-Rotor; Sorvall-Zentrifuge) geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 30 ml 4 °C kalter  $\text{RuCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert und das Zellpellet in einem Volumen  $\text{RuCl}_2$ -Lösung mit 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Aliquots zu je 100  $\mu\text{l}$  wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert .

### 4.5 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 10  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 45 sek) wurde erneut auf Eis inkubiert für 5 min. Nach Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  LB-Medium wurde der Ansatz 30 min bei 37 °C geschüttelt (Thermomixer, Eppendorf 5436). 100  $\mu\text{l}$  bzw. 200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden jeweils auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen (Sambrook, 1989).

## 4.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 2 ml oder 5 ml Übernachtskulturen in LB/Antibiotika-Medium durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook, 1989). Die Zellen der Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 15 min) und in 200 µl Lösung A (25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0) aufgenommen. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 250 µl Lösung B (0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v)) alkalisch lysiert und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisierung und Fällung der Proteine wurden 180 µl eiskalte Lösung C (3 M Kaliumacetat, pH 4,8) zugegeben und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand mit 400 µl Phenol/Chloroform-Lösung gemischt und 2 min auf Eis inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 5 min) getrennt. Die in der wässrigen Phase enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 800 µl eiskaltem Ethanol gefällt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert (14000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und die pelletierte DNA mit 200 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde an Luft getrocknet, in 20 µl TE-Puffer pH 8,0 oder sterilem Wasser aufgenommen und mit 1,5 µl RNaseA-Lösung versetzt.

## 4.7 Isolierung von chromosomaler DNA

Die chromosomale DNA aus dem Organismus *Geobacter metallireducens* wurde nach dem Protokoll von Murray und Thomson (1980) isoliert. 10-20 mg Bakterienzellmasse wurden in 567 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 30 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung lysiert. Um die bakteriellen Proteine abzubauen, wurden 3 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl-Lösung und 80 µl CTAB/NaCl-Lösung (10 % (w/v) CTAB, 0,7 M NaCl), die auf 50 °C vorgewärmt war, wurde der Ansatz gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Dadurch wurde eine Fällung der Proteinreste und Zellwände bewirkt, während die Nukleinsäuren in Lösung blieben. Im Anschluss wurde die wässrige Phase zweimal mit jeweils 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde die wässrige Phase mit 300 µl Isopropanol überschichtet, um die chromosomale DNA an der Grenzschicht der beiden Phasen zu fällen. Die gefällte DNA wurde in 200 µl 70 %iges (v/v) Ethanol überführt und zentrifugiert (14000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und der DNA-Niederschlag an Luft getrocknet. Die

chromosomale DNA wurde in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  nach Zusatz von 10  $\mu\text{l}$  RNase A-Lösung gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

## 5. Enzymatische Tests

### 5.1 Enzymtest zur Bestimmung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Aktivität

Die Hydratisierung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde photometrisch bei Raumtemperatur durch Abnahme der Absorption bei 290 nm gemessen. Es wird angenommen, dass das bei der Reaktion entstehende (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA bei 290 nm nicht absorbiert, da die dafür verantwortliche Doppelbindung durch die Anlagerung des Wassermoleküls verschwindet. Als Extinktionskoeffizient von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bei 290 nm wurde experimentell ein Wert von  $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt, indem die Absorption genau eingewogener Mengen gemessen wurde. Der Testansatz für Messungen im Photometer enthielt in 0,5 ml Gesamtvolumen 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung (ca. 50  $\mu\text{g}$  Protein bei angereicherten Enzymfraktionen), 500  $\mu\text{M}$  (*E*)-Phenylitaconyl-CoA und 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,2. Messungen im ELISA-Reader wurden mit einem Gesamtvolumen von 250  $\mu\text{l}$  bei gleichen Konzentrationen der Komponenten durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gestartet und bei 290 nm verfolgt. Als Referenz wurden gleichzeitig identische Ansätze ohne Zugabe des Enzyms analysiert, da sich gezeigt hatte, dass das Substrat bereits bei pH-Werten um 7 enzym-unabhängig hydrolysiert, wobei ebenfalls die Absorption bei 290 nm sinkt.

### 5.2 Enzymtest zur Bestimmung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase-Aktivität

Das Substrat der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase ist kommerziell oder durch einfache chemische Synthese nicht zugänglich. Deshalb wurde versucht, die Oxidation von (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA in einem gekoppelten Enzymtest mit der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu ermitteln. Der Testansatz enthielt 500  $\mu\text{M}$  NAD als Elektronenakzeptor, 500  $\mu\text{M}$  (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, 50 mM K-Puffer (pH 6,2) und 90  $\mu\text{l}$

Proteinlösung (ca. 50 µg angereicherte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratasefraktion nach DEAE-Chromatographie und 0,4 mg gereinigte (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase nach DEAE-Chromatographie). Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Aktivität der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase ist die Messung der Zunahme der Absorption bei 365 nm durch die Reduktion von NAD. Eine alternative Möglichkeit wurde durch Zugabe von 0,5 mM Phenylhydrazin zum Testansatz ausgetestet. Hierbei sollte das durch die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase gebildete Keton Benzoyl-Succinyl-CoA in Form eines Phenylhydrazons abgefangen werden. Phenylhydrazone zeichnen sich durch eine charakteristische Absorption bei 324 nm aus. Als letzte Möglichkeit der Messung der Enzymaktivität der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase wurde versucht, das Produkt durch HPLC nachzuweisen. Hierzu wurde ein diskontinuierlicher Enzymtest unter den identischen Bedingungen wie im photometrischen Ansatz durchgeführt. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) NaHSO<sub>4</sub> wurde die Proteinfraction durch Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 15 min) abgetrennt, und der Überstand via HPLC (C18, „reversed phase“) auf Bildung eines Produkts untersucht.

### **5.3 Enzymtest zur Bestimmung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase-Aktivität**

#### **5.3.2 Quantitative Bestimmung mittels HPLC**

Die Aktivität gereinigter rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erfolgte durch Detektion des Produkts (*R*)-Benzylsuccinat via HPLC. Der Testansatz (Gesamtvolumen: 250 µl) enthielt 10 mM Fumarat, 1,1 mM Toluol, 2 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2-14 mM NaDithionit, 0,2 mM S-Adenosylmethionin (SAM), 100 mM Tris/HCl pH 7,5, Titancitrat in variierenden Konzentrationen (1-4 mM) sowie *E. coli*-Rohextrakt mit überproduziertem aktiverendem Enzym und gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (mind. 35 µg gereinigte Fraktion nach Affinitätschromatographie). Verschiedene schwefel- oder eisenhaltige Substanzen wie Mercaptoethanol, Na<sub>2</sub>S und Fe(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> wurden dem Ansatz im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 – 1 mM zugesetzt und auf Steigerung der Enzymaktivität getestet. Nach abgelaufener Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 5 M NaHSO<sub>4</sub> gestoppt und die durch die Säurepräzipitierten Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde durch HPLC aufgetrennt und auf Produktbildung untersucht. Neben der typischen Elutionszeit zeigt (*R*)-Benzylsuccinat im UV/Vis-Detektor

ein charakteristisches Spektrum mit einem Maximum bei 210 nm sowie einem weiteren schwächerem Maximum bei 258 nm.

### 5.3.3 Qualitative Bestimmung mittels Western-Blot

Aktivierte rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase sollte wie das native Protein ein Glycylradikal enthalten und bei Inkubation mit Sauerstoff oxygenolytisch gespalten werden, wie es für diese Enzymfamilie charakteristisch ist. Dies wurde am Beispiel des Glycylradikalproteins Pyruvat-Formiat-Lyase bereits von Knappe *et al.* (1984) gezeigt. Nach Abspaltung eines 4 kDa großen Fragments am Carboxyterminus einer der  $\alpha$ -Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) sollte nach einer Auftrennung des Proteins auf einem SDS-Gel eine Doppelbande zu erkennen sein. Die Bande bei 98 kDa entspricht den nicht gespaltenen  $\alpha$ -Untereinheiten, die Bande bei 94 kDa den  $\alpha$ -Untereinheiten, die das Glycylradikal trugen. Mit Antikörpern gegen den am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit lokalisierten Strep-Tag sollten sich sowohl ungespaltene wie auch oxygenolytisch gespaltene  $\alpha$ -Untereinheiten mittels Western-Blot detektieren lassen. Die Beschreibung der genauen Durchführung ist unter 8.3 in diesem Kapitel zu finden.

## 6. Reinigung von Enzymen

Aerobe Enzymreinigungen wurden für die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase und das rekombinante, aktivierende Enzym mit einem FPLC-System von Pharmacia bei 4 °C durchgeführt. Anaerobe Enzymreinigungen wurden für die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep ebenfalls bei 4 °C mit Hilfe einer Perestaltikpumpe (Gilson) im Anaerobenzelt (Coy Instruments, Grass Lake, MI, USA) durchgeführt. Die Säulen wurden hierbei durch einen Kühlmantel mit einem angeschlossenen Kühlwasserbad (Haake K15) gekühlt. Relevante Enzymfraktionen wurden mit Hilfe von „Amicon Ultra“ Filtereinheiten (Millipore) entweder in einer Tischzentrifuge (Hettich, Eba 8S, Tuttlingen) oder in einer Sorvallzentrifuge (GSA-Rotor mit Einsätzen) ankonzentriert (Proteinkonzentration > 1 mg/ml), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80 °C gelagert. Falls sich kein Glycerin im Reinigungspuffer befand wurde dies vor Lagerung (10 % (w/v)) zugegeben.

## 6.1 Reinigung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

### 6.1.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephharose

9 ml 100.000 g-Überstand von *E.coli* mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde auf eine DEAE-Säule (30 ml) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer (10 mM Tris/HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerin(w/v), pH 8.0) äquilibriert wurde. Die Säule wurde nach Auftrag des Zellextrakts mit drei Säulenvolumina Grundpuffer mit einer Flussrate von 3 ml min<sup>-1</sup> gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-200 mM KCl über 10 Säulenvolumen eluiert. Es wurden Fraktionen à 4,5 ml gesammelt. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte in einem Volumen von 50 ml bei einem Salzgehalt von 75-125 mM KCl.

### 6.1.2 Chromatographie an Hydroxylapatit

Ein Drittel des Eluats (15 ml) wurde auf 50 ml mit Grundpuffer verdünnt, so dass die verbleibende Salzkonzentration in der Proteinlösung etwa 30 mM KCl betrug. Die somit teilweise entsalzte Fraktion wurde auf eine Hydroxylapatit-Säule (Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite, Biorad; Volumen: 6ml) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer äquilibriert wurde. Die Säule wurde dann mit drei Säulenvolumina Grundpuffer und einer Flussrate von 0,6 ml min<sup>-1</sup> gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-100 mM Kaliumphosphat in Grundpuffer über 15 Säulenvolumina eluiert. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte in einem Volumen von 15 ml bei einer Konzentration von 30- 40 mM Kaliumphosphat.

### 6.1.3 Gelfiltration zur Bestimmung der nativen Molekülmasse

Die Bestimmung der nativen Molekülmasse der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase erfolgte über Chromatographie an einer Superdex 200 HR -Gelfiltrationssäule (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg; Volumen: 25 ml). Die Säule wurde zuvor mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl mit einer Flussrate von 0,3 ml min<sup>-1</sup> äquilibriert. Es wurden 500 µl Proteinlösung (ankonzentrierte Hydroxylapatitfraktion) aufgetragen. Fraktionen à 0,4 ml wurden aufgefangen. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte bei einer Flussrate von 0,3 ml min<sup>-1</sup> nach 45 min in einem Volumen von 1,6 ml. Die Säule war bereits durch mehrere

Läufe mit folgenden Standardproteinen geeicht worden: Carboanhydrase (29 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Katalase (240 kDa) und Ferritin (450 kDa).

## **6.2 Reinigung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase**

Die Reinigung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase erfolgte über einen chromatographischen Schritt an DEAE-Sepharose analog des Protokolls, das von Kerstin Hermuth in ihrer Doktorarbeit (Freiburg, Oktober 2002) bereits beschrieben wurde.

### **6.2.1 Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose**

15 ml 100.000 g-Überstand von *E.coli* mit überproduzierter (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase wurde auf eine DEAE-Säule (Amersham Biosciences; Säulenvolumen: 30 ml) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer (10 mM Tris/HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % Glycerin(w/v), pH 8.0) äquilibriert wurde. Die Säule wurde nach Auftrag des Zellextrakts mit fünf Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 3 ml min<sup>-1</sup> gewaschen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten von 0-300 mM KCl in Grundpuffer über 20 Säulenvolumen eluiert. Es wurden Fraktionen à 7,5 ml gesammelt. Die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase eluierte in einem Volumen von 75 ml bei einem Salzgehalt von ca. 20-110 mM KCl.

## **6.3 Reinigung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag**

Die Reinigung von (R)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag war bereits von Joachim Hogg etabliert worden (persönliche Mitteilung). Dabei handelte es sich um eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und anschließender Affinitätschromatographie an Strep-Tactin Superflow (IBA, Göttingen). Das Reinigungsprotokoll konnte im Verlauf der weiteren Arbeit entscheidend verkürzt werden. Durch Waschen der Affinitätssäule mit Hochsalzpuffer und anschließende Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin wurde die (R)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag ebenfalls in höchster Reinheit erhalten, wodurch man auf die vorangehende Chromatographie an DEAE-Sepharose verzichten konnte.



### 6.3.1 Affinitätschromatographie an Strep-Tactin-Superflow

10 ml 100.000g- Überstand von *E.coli* mit überproduzierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag wurde auf eine Strep-Tactin-Superflow-Säule (10 ml; IBA, Göttingen) aufgetragen, die zuvor mit Grundpuffer (10 mM Triethanolamin pH 8,0, 160 mM NaCl) äquilibriert wurde. Die Säule wurde nach Auftragen des Zellextraktes mit zwei Säulenvolumina Grundpuffer bei einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit drei Säulenvolumina 0,5 M NaCl in Grundpuffer gewaschen, bevor erneut mit drei Säulenvolumina Grundpuffer gespült wurde. Nach diesen Waschschritten wurde durch Anlegen von Grundpuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin reine (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag eluiert. Die Säule wurde nach der Anwendung gemäss der Anleitung des Herstellers mit 1 mM HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid) konserviert.

## 6.4 Reinigung des aktivierenden Enzyms mit His-Tag

### Affinitätschromatographie an His-Trap-Säulen

5 ml 100.000g- Überstand von *E.coli* mit überproduziertem aktivierendem Enzym mit His-Tag wurde auf eine His-Trap-Säule (1 ml, Amersham Biosciences) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit Grundpuffer (200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5; 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol) äquilibriert. Nach Auftragen des Zellextraktes wurde die Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min mit zehn Säulenvolumina Grundpuffer gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit einem linearen Gradienten von 0-500 mM Imidazol in 30 Säulenvolumen eluiert. Das aktivierende Enzym mit His-Tag eluierte bei einer Flussrate von 1 ml/min bei einer Imidazolkonzentration von ca. 135 mM in einem Volumen von 3 ml.

## Rekonstitution der Fe-S-Zentren

Aerob gereinigtes aktivierendes Enzym mit His-Tag wurde unter anaeroben Bedingungen in einer Lösung aus 50 mM Mops/KOH pH 7,5, 0,1 M NaCl und 0,1 M Mercaptoethanol mit 0,2 mM Na<sub>2</sub>S und 0,25 mM Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> rekonstituiert. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 4 °C.

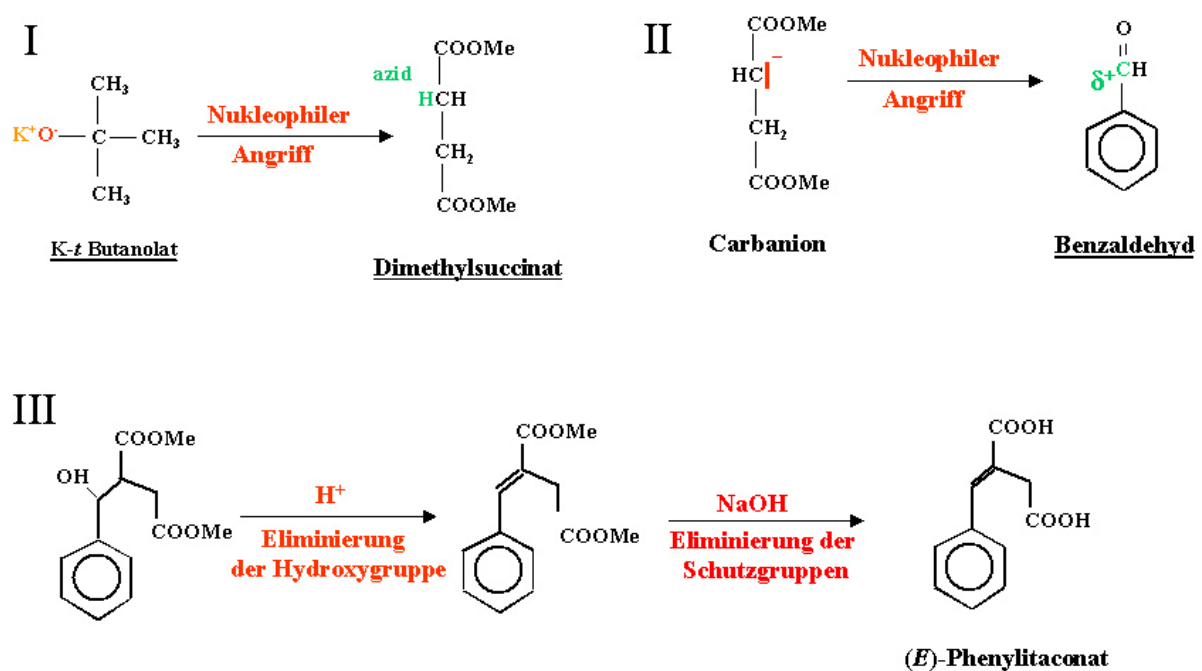
## 7. Chemische Arbeitsmethoden

### 7.1 Synthese von (*E*)-Phenylitaconat

Die Synthese von (*E*)-Phenylitaconat (Benzylidensuccinat) erfolgte analog dem Protokoll von Ravina et al. (2002).

Eine Lösung aus 35 mmol (3,8 g) Benzaldehyd und 44 mmol (6,4 g) Dimethylsuccinat in 5 ml *tert*-Butanol wurde über 3 h tropfenweise einer Mischung aus 39 mmol (4,3 g) *K-tert*-Butanolat in 25 ml *tert*-Butanol zugegeben, die unter Reflux gekocht wurde. Die Rücklaufkühlung wurde drei weitere Stunden fortgesetzt, anschließend wurde das Lösungsmittel *t*-Butanol mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abgedampft. Der erhaltene Niederschlag wurde in 25 ml 1 N wässriger HCl gelöst, und die Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat (je 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zu einem öligen Extrakt einrotiert. Dieses Öl wurde in Methanol (15 ml) gelöst, anschließend wurden 25 ml einer 15 %igen Lösung von NaOH in Methanol zugegeben und die Mischung für 12 h unter Rücklaufkühlung gekocht. Die erhaltene Suspension wurde einrotiert und in Wasser (38 ml) aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat (je 25 ml) gewaschen, mit konzentrierter HCl auf pH 3 angesäuert und dann wieder dreimal mit Ethylacetat (je 25 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und mittels eines Rotationsverdampfers 8-fach ankonzentriert. Aus dieser Lösung wurde (*E*)-Phenylitaconat durch Zugabe eines Gemischs von Ethylacetat und Hexan weißer Feststoff auskristallisiert und in einer Fritsche von der Flüssigkeit getrennt. (*E*)-Phenylitaconat wurde bei 55 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur auf Silicagel gelagert.

Das Prinzip der Synthese beruht darauf, dass das *t*-Butanolat das azide C2-Atom von Dimethylsuccinat nukleophil unter Ausbildung eines Carbanions angreift. Anschließend lagert sich dieses Intermediat an das elektrophile Kohlenstoffatom des Benzaldehyds an. Die entstehende Verbindung ist dann der Dimethylester von 2-Carboxymethyl-3-Hydroxyphenylpropionat. Die Hydroxylgruppe am  $\beta$ -C-Atom wird durch die Behandlung mit Salzsäure eliminiert, wodurch (*E*)-Phenylitaconat entsteht. In einem letzten Schritt werden die Methyl-Schutzgruppen durch alkalische Hydrolyse abgespalten.



**Abb. 3: Prinzip der Synthese von (*E*)-Phenylitaconat** (nach Ravena et al. (2002)). **I** *t* Butanolat greift das azide Wasserstoffatom von Dimethylsuccinat nukleophil an und abstrahiert ein Proton. **II** Das entstandene Carbanion greift das Kohlenstoffatom der Methylgruppe des Benzaldehyds nukleophil an und addiert kovalent. **III** Zuerst wird die Hydroxygruppe am  $\beta$ -C-Atom des Intermediats durch saure Hydrolyse eliminiert. Anschließend werden die Methylschutzgruppen der Carboxylgruppen durch alkalische Hydrolyse entfernt. Die unterstrichenen Substanzen befanden sich zu Beginn im Versuchsansatz. Die nicht-unterstrichenen Begriffe sind Intermediate der Synthese bzw. das Endprodukt. „Me“ = Methylgruppe.

## 7.2 Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA

(*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde über das Anhydrid der (*E*)-Phenylitaconsäure synthetisiert. Das Anhydrid von (*E*)-Phenylitaconat war nicht kommerziell erhältlich und wurde aus der freien Säure und Essigsäureanhydrid hergestellt: 384  $\mu\text{mol}$  Phenylitaconat (90 mg) wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 80 °C in 800  $\mu\text{l}$  Essigsäure gelöst; anschließend wurden 36,6  $\mu\text{l}$  Essigsäureanhydrid (384  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde so lange bei 120 °C inkubiert, bis das Lösungsmittel Essigsäure sowie die Essigsäure, die aus dem Essigsäureanhydrid freigesetzt wurde, komplett verdampft waren (Siedepunkte: Essigsäure: 118,2 °C, Essigsäureanhydrid: 139,0 °C; Dawson *et al.*, 1986). Man erhielt das Anhydrid der Phenylitaconsäure, das bei 120 °C flüssig war und bei Abkühlung auf Raumtemperatur fest wurde. Für die Synthese der CoA-Thioester wurden in einem Anaerobenzelt 120  $\mu\text{mol}$  CoA (Tri-Lithium-Salz) und 384  $\mu\text{mol}$  gemörsertes Phenylitaconsäureanhydrid in 10 ml anaerobisiertem 100 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7,5) gelöst. Der Ansatz wurde etwa 2 h auf Eis gerührt. Die Reaktion wurde durch den Nachweis freier SH-Gruppen mit dem Nitroprussid-Test auf Vollständigkeit überprüft. Nach Ablauf der Reaktion wurde der Ansatz mit 1 M HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 2,5 - 3 eingestellt. Die übrig gebliebenen protonierten organischen Säuren wurden dreimal mit je 30 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die wässrige, CoA-Thioester enthaltende Phase wurde lyophyliert. Der getrocknete Rückstand wurde bei – 20 °C über Silikagel aufbewahrt. Die Reinheit und der Gehalt wurden über HPLC bestimmt.

## 8. Elektrophoretische und immunologische Methoden

### 8.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in Agarose-Gelen (6,5 x 10 x 0,5 cm<sup>3</sup>) nach Größe und Konformation getrennt. 1 % (w/v) Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gegeben, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml; Roth, Karlsruhe) versetzt. Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen und ein Taschenformer eingesetzt. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde der Taschenformer entfernt und die mit Ladepuffer gemischte DNA-Lösung aufgetragen (10-30  $\mu\text{l}$ ). Die Elektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Nach Beenden des

Trennungsvorgangs wurde das Gel mit UV-Licht bei 312 nm mit einer UV-Durchlichtlampe (IL 200M, Bachhofer, Reutlingen) analysiert. Als Längenstandard und zur Abschätzung der DNA-Menge wurde ein „DNA-ladder-Mix“ (New England Biolabs oder MBI Fermentas) eingesetzt.

50 x TAE-Puffer:

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

50 mM EDTA

ad 1 l H<sub>2</sub>O demin.

6 x Ladepuffer:

6 ml Glycerin

1,2 ml 50 x TAE

Spatelspitze Bromphenolblau

## **8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteine wurden nach ihren apparenten Molekülmassen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt.

### **8.2.1 Probenvorbereitung**

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Der Probenpuffer ist zusammengesetzt aus 0,25 mM Dithioerythrit, 60 % (w/v) Glycerin, 0,2 M Tris/HCl (pH 6,8), 2 % SDS und 0,01 % Bromphenolblau. Probenvolumen von 10-30 µl wurden auf das Gel aufgetragen. Als Proteinstandard wurde ein Gemisch aus folgenden Proteinen eingesetzt: Phosphorylase B (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat-Dehydrogenase (34 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Lysozym (14 kDa). Jede Bande enthielt 1,7 µg Protein. Der Proteinstandard wurde wie die Proben behandelt.

### 8.2.2 Trichloressigsäurefällung

Proben mit einem niedrigen Proteingehalt wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel mit Trichloressigsäure gefällt. Dazu wurden 90 µl Proteinlösung mit 30 µl 24 %-iger Trichloressigsäure (w/v) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Niederschlag wurde in 10 µl Probenpuffer aufgenommen. Zeigte sich ein Farbumschlag von blau nach gelb so wurde mit 10 µl 0,1 M NaOH nachtitriert. Die blaue Lösung wurde wie oben bereits beschrieben 5 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen.

### 8.2.3 Gelzusammensetzung und Laufbedingungen

Die Trenngele setzten sich zusammen aus 7,5-15 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %; v/v), 450 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, 0,001 % (v/v) TEMED. Die Sammelgele enthielten 4 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %; v/v), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, 0,001 % (v/v) TEMED. Die Trenngele waren 9,5 cm lang. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei Raumtemperatur. Während die Probe sich im Sammelgel befand, wurde eine Spannung von 90 V angelegt. Erreichte die Probe das Trenngel wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Der Laufpuffer setzte sich zusammen aus 24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreichte.

### 8.2.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte mit Coomassie-Blau (0,25 % (w/v) Coomassie-Blau R250, 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Sämtliche Schritte wurden unter Schwenken bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Gele wurden nach dem Lauf kurz mit H<sub>2</sub>O demin. abgespült und dann über Nacht in Coomassie gefärbt. Anschließend wurden die Gele 30 min in Entfärber (30% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) entfärbt.

### 8.3 Übertragung von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Membranen

Proteine für die Western-Blot Analyse wurde nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Nitrocellulose-Membran (Typ 885, Schleicher Schüll, Dassel) übertragen. Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membranen (Millipore, Bedford, USA) eingesetzt. Der Transfer der Proteine erfolgte entweder über das Semi-Dry-Verfahren nach Kyshe-Andersen (Kyshe-Andersen, 1984) mit dem Multiphor-System II (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) oder via Nass-Blot (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg).

Im Semi-Dry-Verfahren wurden folgende Puffer verwendet:

<u>Anodenpuffer I (pH 10,4):</u>	300 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol
<u>Anodenpuffer II (pH 10,4):</u>	25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol
<u>Kathodenpuffer (pH 7,3):</u>	100 mM $\epsilon$ -Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) SDS
<u>Ponceau-Färbelösung:</u>	0,1 % (w/v) Ponceau S, 0,5 % (v/v) Essigsäure

Für jedes Gel wurden sechs Filterpapiere (Whatman, 3 mm) und eine Membran genau auf die Maße des Gels zurechtgeschnitten. Das Gel und die Nitrocellulose-Membran wurden in Anodenpuffer II äquilibriert. Die Transferapparatur war wie folgt aufgebaut: auf die mit destilliertem Wasser benetzte Anode wurden zwei mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere, dann ein mit Anodenpuffer II benetztes Filterpapier gelegt. Darauf wurde die Membran, dann das Gel und abschließend drei mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Zuletzt wurde die Kathode angelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche über 80 min. Zur Kontrolle wurde die Nitrocellulose mit Ponceau S gefärbt. Die Membran wurde dazu 5 min in der Färbelösung geschwenkt und mit H<sub>2</sub>O demin. kurz gespült.

Im Nass-Blot wurde folgender Transferpuffer eingesetzt:

25 mM Tris                      pH 8,3-8,6  
192 mM Glycin  
20 % Methanol

Die Nitrozellulosemembran und zwei Filterpapiere wurden etwa in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Die feuchte Nitrozellulosemembran sowie die Filterpapiere und das SDS-Gel wurden gemäss Anleitung des Herstellers in die mit Transferpuffer befüllte Transferapparatur eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte bei 300 mA über 1 h. Nach dem Blotten wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, um die Effizienz des Transfers zu verfolgen. Die Nitrozellulosemembran wurde zur Kontrolle mit Ponceau S gefärbt und mit H<sub>2</sub>O demin. vor weiterer Verwendung wieder entfärbt.

## 8.4 Immunologischer Nachweis („Western Blot“)

Proteinlösungen oder Zellextrakte wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (s.o.). Für die Bindung der Antikörper wurden folgende Lösungen verwendet:

<u>Phosphat-Tween-Puffer (PBS-Tween):</u>	137 mM NaCl	pH 7,5
	2,7 mM KCl	
	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

Blockierlösung: 5 % (w/v) Trockenmilchpulver in Phosphat-Tween-Puffer oder  
5 % (w/v) Bovines Serumalbumin (Bovines Serumalbumin wurde bei  
den Antikörpern gegen den Strep-Tag eingesetzt, da  
Trockenmilchpulver hier zu vielen unspezifischen Signalen führt.)

Immunoreagenzlösung: 50 % (v/v) Reagenzlösung I  
50 % (v/v) Reagenzlösung II

Reagenzlösung I: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarsäure, 100 mM Tris/HCl pH 8,5

Reagenzlösung II: 6,2 µl 30 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,5,  
ad 10 ml H<sub>2</sub>O

Die beiden Reagenzlösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch gemischt.



Damit die Antikörper nicht unspezifisch an die Membranoberfläche binden, wurde die mit Protein beladene Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in der Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 5 min und einmal 15 min in PBS-Tween gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper bzw. mit dem Antikörper gegen den Strep-Tag inkubiert. Das Antiserum wurde dazu direkt vor Gebrauch in PBS-Tween-Puffer verdünnt (Antikörper gegen Strep-Tag: 1:1.000.000, Antikörper gegen die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase: 1: 50.000, Antikörper gegen die (*R*)-Benzylsuccinatsynthase: 1: 10.000). Danach wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz für 1 h mit Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen Sekundärantikörpern (RP 2108, Amersham-Pharmacia) in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS-Tween inkubiert (in den Ansätzen mit Antikörpern gegen die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und (*R*)-Benzylsuccinatsynthase). Bei den Antikörpern gegen den Strep-Tag, die an eine Peroxidase gekoppelt vorlagen, konnte auf einen zweiten Antikörper verzichtet werden. Überschüssige Zweitantikörper wurden durch die oben beschriebenen Waschschrte entfernt. Die Membranoberfläche wurde dann mit Immunoreagenzlösung (0,1 ml/cm<sup>2</sup>) beträufelt und etwa 5 min inkubiert. Auf die mit Frischhaltefolie abgedeckte Membran wurde der Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia) aufgelegt und 0,5-10 min exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte durch kurzes Baden des Films in Entwicklerlösung bis Banden zu Erkennen waren. Anschließend wurde die Membran kurz mit Wasser gespült und dann ca. 10 min in Fixierlösung inkubiert. Um die Banden auf dem Röntgenfilm dem Molekularmassenstandard zuordnen zu können, wurden die durch die Ponceaufärbung markierten Banden des Standards übertragen.

## 9. Analytische Methoden

### 9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde eingesetzt, um Substrate und Produkte des anaeroben Toluolstoffwechsels zu trennen und zu identifizieren. Dazu wurde eine WATERS 2690-HPLC-Anlage mit einem gekoppelten Dioden-Array-Detektor L-3000 (WATERS, Eschborn) verwendet. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine LiCrospher RP-C18 Säule (300 mm x 4 mm x 5 µm; Merck). Die Detektion der freien

aromatischen Säuren (*R*)-Benzylsuccinat und (*E*)-Phenylitaconat erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit einer Pufferzusammensetzung von 20 % Acetonitril, 32 mM Ameisensäure pH 3,0 und einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup>. CoA-Thioester wurden in einem Acetonitrilgradienten von 3-20 % Acetonitril in 30 min aufgetrennt. Die Elutionszeiten der untersuchten Verbindungen unter den beschriebenen Bedingungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Verbindung	Elutionszeit [min]	Laufbedingung
( <i>R</i> )-Benzylsuccinat	10,5	isokratisch
( <i>E</i> )-Phenylitaconat	14	isokratisch
Freies CoA	4,2	Acetonitril-Gradient
Benzoyl-CoA	20	Acetonitril-Gradient
( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA	5,2	Acetonitril-Gradient
(Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA	5	Acetonitril-Gradient

**Tab. 4:** Elutionszeiten untersuchter Intermediate des Toluostoffwechsels auf einer LiCrospher RP-C18 Säule (300 mm x 4 mm x 5 µm; Merck) unter verschiedenen Laufbedingungen.

Die bei der HPLC eingesetzten Puffer wurden alle vor Verwendung mit einem 0,2 µm-Filter filtriert, um Schwebepartikel zu entfernen. Proteinhaltige Proben wurden wie folgt für die HPLC-Analyse vorbereitet: Nach Zugabe von 2,5 % (v/v) NaHSO<sub>4</sub> wurde das präzipitierte Protein durch Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein HPLC-Röhrchen überführt.

## 9.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Als Standard wurde bovines Serumalbumin eingesetzt.

### 9.3 N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Die N-terminale Sequenzierung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA-Hydratase wurde von Herrn Brunisholz (ETH Zürich) durchgeführt.

## 10. Spektroskopische Methoden

### 10.1 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit einem Perkin Elmer UV/Vis Spektrometer Lambda 2 (Überlingen) aufgenommen. Gereinigte Enzyme wurde über einen Bereich von 200-600 nm gescannt. CoA-Thioester und freie organische Säuren wurden in einem Wellenlängenbereich von 200-350 nm analysiert. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Messung gegen die Lösung, in der sich die Substanz befand.

### 10.2 Massenspektrometrische Untersuchungen

Massenspektroskopische Messungen wurden von Hr. Warth am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Freiburg durchgeführt.

Zur Identifizierung von CoA-Thioestern wurden Elektrospray Ionization-Massenspektren (ESI) über ein Thermo Finnigan LCQ Advantage-System (Thermo Electron; Dreieich / Kapillartemperatur 330 °C, source induced dissociation voltage 10 V) aufgenommen, das gekoppelt war an ein „Surveyor“ HPLC-System mit einer Reprosil C18-Säule (5 µm, 4 x 125 mm, Wicom; Heppenheim). Die Massenspektren wurden für einen Bereich von *m/z* 300-1500 gewonnen. Zur Trennung der Verbindungen wurde ein Gradient von 0 % Acetonitril auf 10 % Acetonitril in 0,5 % Triethylammoniumhydrogencarbonat (1 M) pH 8,5 in 10 min benutzt.

(*E*)-Phenylitaconat wurde in Methanol gelöst und durch „negative APCI (atmospherical pressure chemical ionization)-Flussinjektion am oben genannten Thermo Finnigan LCQ Advantage-System untersucht.

### 10.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Sämtliche ESR-Spektren wurden von Prof. Thorsten Friedrich an der Universität Freiburg gemessen.

#### 10.3.1 Probenvorbereitung

Die ESR-Proben wurden unter strikt anaeroben Bedingungen im Anaerobenzelt vorbereitet. Die ESR-Spektren von unbehandelter gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag sowie die Effekte von 10-minütiger Inkubation mit den Inhibitoren CO, Cyanid, NO und Luft wurden untersucht. Dazu wurde gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag sofort nach der Affinitätschromatographie auf 5-8 mg/ml ankonzentriert und entweder sofort oder nach Inhibitorbehandlung á je 300 µl in ein ESR-Röhrchen abgefüllt. Die Konzentration der gasförmigen Inhibitoren betrug je 50 % der Gasphase (v/v). Das entspricht Konzentrationen von 140 µM CO, 280 µM NO und 25 µM des Luftsauerstoffes in gelöster Form in der wässrigen Phase. Die befüllten ESR-Röhrchen wurden mit einem 3-4 cm langen Latexschlauch, der am oberen Ende mit einem Plastikstück verschlossen war, gegen Luft abgedichtet. Die so verschlossenen Röhrchen wurden aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach dem Einfrieren wurde der Latexschlauch entfernt. Die Lagerung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff.

#### 10.3.2 Ausrüstung und Bedingungen

Die ESR-Spektren wurden an einem Bruker EMX-6/1 X-Band ESR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Das Gerät ist ausgerüstet mit einem rechtwinkligen Standard TE 102 Hohlraumresonator und einem ESR-900 Helium-Durchflußkryostaten (Oxford Instruments, Oxford, UK), der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen ermöglichte (10 K- 57 K). Die ESR-Spektren wurden unter nicht gesättigten Bedingungen aufgenommen. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm WINEPR (Bruker) benutzt. Für die Spinquantifizierung wurde eine 1 mM CuSO<sub>4</sub>- Lösung in 1 mM EDTA und 10 mM HCl verwendet.

## 11. Proteinkristallisation

### 11.1 Probenvorbereitung

Anaerob gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag wurde im Anaerobenzelt mit Hilfe von Amicon Ultra Zentrifugen Filtereinheiten (Millipore) durch Zentrifugation (10000 rpm) auf die gewünschte Proteinkonzentration (5-30 mg/ml) angereichert. Um präzipitiertes Protein zu entfernen, wurde der ankonzentrierte Ansatz nochmals zentrifugiert (5 min, 10000 rpm) und der klare Überstand für die Kristallisation eingesetzt.

### 11.2 „Sitting drop“-Technik

Für diese Technik wurden Kristallisationsplatten von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) verwendet. Eine Platte besteht aus zwölf entnehmbaren Reihen für jeweils acht Ansätze. Pro Ansatz wurden jeweils 100 µl Puffer in das Reservoir pipettiert. Davon wurden anschließend 2,5 µl entnommen und mit einem in die Vertiefung vorgelegten ebenfalls 2,5 µl großen Proteintropfen vermischt. Nachdem die Ansätze einer Reihe fertiggestellt waren, wurde dieser sofort mit Tesafilm („kristallkar“) verschlossen, um das Verdunsten der Tropfen zu minimieren. Direkt nach dem Verschließen der Platten mit Tesafilm wurden die Tropfen mit einem Mikroskop (Zeiss, Jena; 100x Vergrößerung), das im Anaerobenzelt installiert war, analysiert. In der ersten Woche wurden die Ansätze täglich mikroskopisch untersucht, danach einmal pro Woche.

### 11.3 Ölkristallisation

Hierfür wurden „60 Well Mini Tray“-Platten (Nunc) eingesetzt, wobei die Vertiefungen mit Tropfen mit einer Größe von 2-10 µl befüllt wurden. Die Tropfen setzten sich je zur Hälfte aus Proteinlösung bzw. Kristallisations-Puffer zusammen. Nachdem sämtliche Ansätze einer Platte fertiggestellt waren, wurden diese mit Siliconöl M50 überschichtet. Die Tropfen wurden wie bei der „Sitting drop“-Technik beschrieben analysiert.

## 11.4 Kristallisation von (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag

Mit Kristallisationskits von Hampton Research (crystal screen I und II; Laguna Niguel, USA) bzw. Jena Bioscience crystal screen (Jena, Germany) wurden initiale Screening-Versuche durchgeführt, um Ausgangs-Bedingungen für die Kristallisation des Enzyms zu finden. Nachdem vorläufige Bedingungen gefunden worden waren, wurden die Pufferbedingungen weiter optimiert. Dazu wurden die PEG- und Salzkonzentrationen, der pH-Wert und die eingesetzte Proteinkonzentration variiert. Außerdem wurde der Effekt der Zugabe einiger Additiva wie Dithionit und Glycerin sowie der Substrate Toluol und Fumarat untersucht. Zunächst wurden die Versuche unter aeroben Bedingungen, später ausschließlich unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Bei der Kristallisation im Anaerobenzelt wurden sämtliche eingesetzte Puffer anaerobisiert und die benutzten Plastikmaterialien inklusive der Kristallisationsplatten mindestens einen Tag vor Gebrauch in die Stickstoffatmosphäre eingebracht. Dadurch wurde sichergestellt, dass im Plastik gelöster Sauerstoff vor der Benutzung ausdiffundiert war.

## 11.5 Einfrieren der Kristalle der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag

Das Entnehmen der Kristalle aus den Ansätzen sowie das Einfrieren erfolgte unter aeroben Bedingungen direkt nach Ausschleusen aus dem Anaerobenzelt. Die Kristalle der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Strep-Tag wurden entweder sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren oder zuvor in einen Kryopuffer (5-20 % Glycerin) getaucht. Bis zu ihrer Vermessung wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 11.6 Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Daniel Kloer, Institut für Organische Chemie und Biochemie (Universität Freiburg) durchgeführt.

## ERGEBNISSE

### 1. Untersuchungen zur $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat

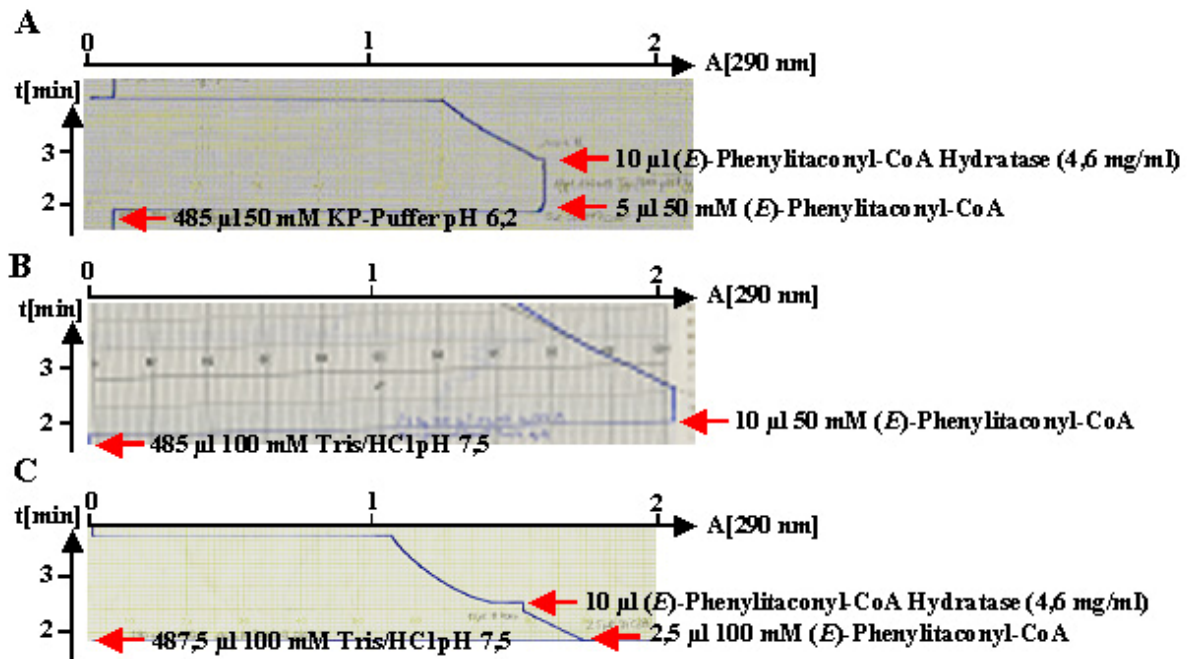
(*R*)-Benzylsuccinat entsteht durch die Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat, die durch das Enzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert wird. Dieses erste Intermediat wird über einen  $\beta$ -Oxidationsweg weiter katabolisiert. (*R*)-Benzylsuccinat wird dabei zunächst durch eine CoA-Transferase zu (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA aktiviert (Leutwein und Heider, 1999), das anschließend durch eine Dehydrogenase zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA oxidiert wird (Leutwein und Heider, 2002). In Rohextrakten wurde zudem die Umsetzung von (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA zu Benzoyl-CoA gezeigt (Biegert *et al.*, 1996; Leutwein und Heider, 1999). Benzoyl-CoA ist ein bekanntes Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels, dessen weiterer Abbau zu Acetyl-CoA bereits gut erforscht ist (Boll und Fuchs, 1995). Beim anaeroben Toluolabbauweg war bislang nicht bekannt, welche Enzyme das Intermediat (*E*)-Phenylitaconyl-CoA weiter zu Benzoyl-CoA umsetzen. Im *bbs*-Operon („beta-oxidation of benzylsuccinate“), das für die Enzyme der ersten Schritte der  $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat kodiert, sind allerdings Gene enthalten, deren Produkte jeweils große Ähnlichkeit zu bekannten Enoyl-CoA Hydratasen, Alkoholdehydrogenasen und  $\beta$ -Ketothiolasen haben (Leuthner und Heider, 1999). Deshalb ist zu vermuten, dass es sich hierbei um die noch fehlenden Enzyme des  $\beta$ -Oxidationswegs handelt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase gereinigt und charakterisiert, die die nächsten beiden Schritte der  $\beta$ -Oxidation von (*R*)-Benzylsuccinat katalysieren.

## 1.1 Reinigung und Charakterisierung der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

### 1.1.1 Photometrischer Test zum Nachweis der Enzymaktivität der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Die Aktivität der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde photometrisch bestimmt. Das Substrat (E)-Phenylitaconyl-CoA zeigt eine charakteristische Absorption bei 290 nm, die vermutlich durch die C-C-Doppelbindung des (E)-Phenylitaconyl-Anteils der Verbindung verursacht wird. Das hydratisierte Produkt sollte aufgrund der Auflösung dieser Doppelbindung nicht bei 290 nm absorbieren. Deshalb wurde die Enzymaktivität durch Messung der Abnahme der Absorption bei 290 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von (E)-Phenylitaconyl-CoA bei 290 nm wurde durch Bestimmen der Absorption genau bekannter Mengen als  $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ermittelt. Der Enzymtest wurde unter aeroben Bedingungen bei Raumtemperatur in einem ELISA-Reader oder in einem Photometer durchgeführt. (E)-Phenylitaconyl-CoA hydrolysiert bei neutralen pH-Werten sehr schnell wieder zu freiem CoA und (E)-Phenylitaconat, was ebenfalls eine Absorptionsabnahme bei 290 nm bewirkt (Abb. 4 B). Eine Messung der Enzymaktivität bei pH 7,5 war somit nicht möglich, da die enzymbedingte Absorptionsabnahme nicht auswertbar war (Abb. 4 C). Deshalb wurden die Enzymtests bei einem pH-Wert von 6,2 durchgeführt (Abb. 4 A). Unter diesen Bedingungen war der Thioester über die Messzeit von 10 min hinreichend stabil. Mit diesem Test konnten allerdings in Rohextrakten wegen zu hoher Hintergrundaktivitäten durch CoA-Thioesterasen keine Messungen gemacht werden. Dagegen zeigte gereinigte rekombinante (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eine spezifische Aktivität von  $61 \pm 5,6 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg}^{-1} \text{ Protein}]$ . Diese spezifische Aktivität liegt bei einem ähnlichen Wert wie bei anderen Enoyl-CoA Hydratasen des anaeroben Aromatenstoffwechsels. Zum Beispiel hat die Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA Hydratase, die am Benzoyl-CoA-Abbau durch *T. aromatica* beteiligt ist, eine spezifische Aktivität von  $58 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg}^{-1} \text{ Protein}]$  (Laempe *et al.*, 1998). Bei jedem Versuch wurde parallel auch die nicht-enzymatische Hydrolyse von (E)-Phenylitaconyl-CoA bestimmt, da diese ebenfalls zum Absinken der Absorption bei 290 nm führt. Bei Bedarf wurden die Enzymaktivitäten entsprechend korrigiert.





**Abb. 4: A** Photometrische Messung zur Bestimmung der Enzymaktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bei pH 6,2. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 290 nm bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA in Kaliumphosphat-Puffer (KP-Puffer) pH 6,2 blieb die Absorption bei 290 nm stabil und nahm erst nach Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase ab. **B** Nicht-enzymatische Hydrolyse von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bei pH 7,5. Die Absorption bei 290 nm nach Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zum Puffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5) wurde bei Raumtemperatur verfolgt. Bereits ohne Enzym nahm die Absorption massiv ab. Der Grund für diese Enzym-unabhängige Reaktion ist vermutlich die Hydrolyse der CoA-Thioesterbindung. **C** Versuch der photometrischen Messung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydrataseaktivität bei pH 7,5. Es ist bereits eine starke Abnahme der Absorption bei 290 nm vor Zugabe des Enzyms zu beobachten. Eine genaue Quantifizierung der durch die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase verursachte Absorptionsabnahme ist so nicht möglich.

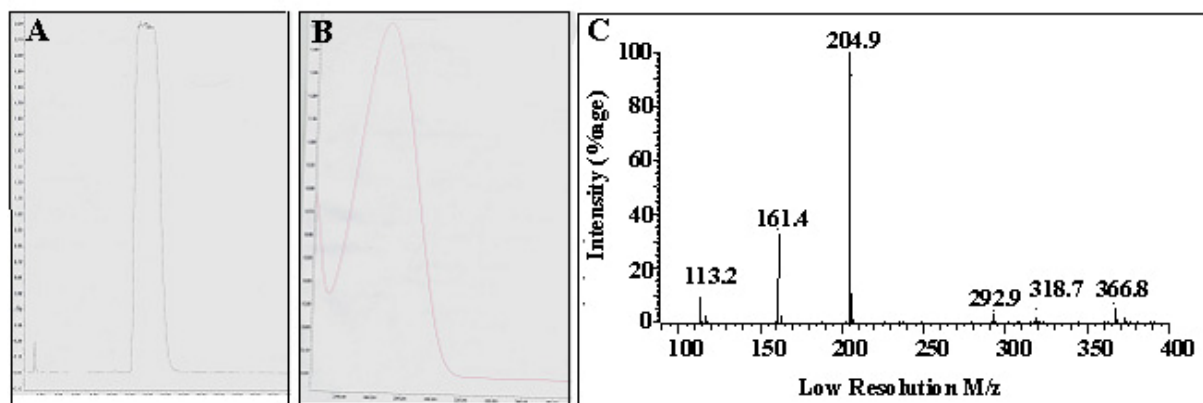
### 1.1.2 Chemische Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA

(*E*)-Phenylitaconyl-CoA, sowie die freie Säure (*E*)-Phenylitaconat, sind kommerziell nicht erhältlich und wurden deshalb selbst synthetisiert. Der verwendete Syntheseweg für (*E*)-Phenylitaconat ist relativ einfach und konnte ohne spezielle Ausrüstung durchgeführt werden. Die freie Säure wurde dann in das Säureanhydrid überführt und daraus über ein Standard-Protokoll zum CoA-Thioester umgesetzt (Schachter und Taggart, 1976).

**Synthese von (*E*)-Phenylitaconat.** Die chemische Synthese von (*E*)-Phenylitaconat wurde nach Ravena et al. (2002) aus Benzaldehyd und Dimethylsuccinat durchgeführt. Aus den

einsetzten Mengen (3,8 g Benzaldehyd und 6,4 g Dimethylsuccinat) wurden schließlich 5,2 g weißes Pulver erhalten, das mit Hilfe von UV/Vis-Spektrometrie, HPLC und Massenspektrometrie als reines (*E*)-Phenylitaconat identifiziert wurde. Die Ausbeute der Synthese lag bei 72 % und stimmte mit den Literaturangaben überein (Ravena, 2002).

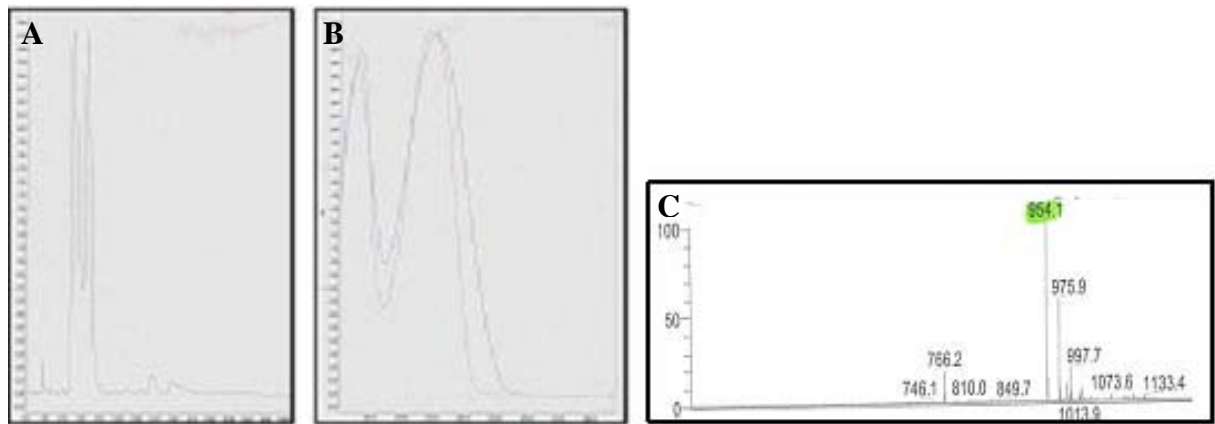
**Analyse des synthetisierten (*E*)-Phenylitaconats.** Das synthetisierte (*E*)-Phenylitaconat zeigte ein für diese Substanz typisches UV-Absorptionsmaximum bei 210 nm, sowie ein weiteres charakteristisches lokales Maximum bei 270 nm (Abb. 5). Zusätzlich wurde das (*E*)-Phenylitaconat mittels „reversed phase“ Chromatographie auf einer HPLC-Anlage analysiert. Unter isokratischen Bedingungen mit 20 % Acetonitril in 36 mM Ameisensäure (pH 3) eluierte das Syntheseprodukt nach 14 Minuten. Das Elutionsprofil der HPLC-Analyse zeigt außerdem, dass das synthetisierte (*E*)-Phenylitaconat zu 99 % als Reinsubstanz vorliegt. Diese Resultate stimmen mit den Ergebnissen der Untersuchung von (*E*)-Phenylitaconat von C. Leutwein überein, obwohl sie einen anderen Syntheseweg gewählt hatte (C. Leutwein, Doktorarbeit). Schließlich wurde die Molekülmasse des (*E*)-Phenylitaconats massenspektrometrisch zu 204,9 Da bestimmt, was sehr gut mit dem erwarteten Wert von 205 Da übereinstimmt.



**Abb. 5: Produktanalyse von (*E*)-Phenylitaconat. A HPLC-Chromatogramm.** Das Syntheseprodukt wurde mittels „reversed-phase“-Chromatographie aufgetrennt. Unter isokratischen Bedingungen bei 20 % ACN in 36 mM Ameisensäure pH 3 eluierte die Substanz bei ca. 12-14 min. Die Retentionszeit für (*E*)-Phenylitaconat liegt bei identischen Bedingungen ebenfalls in diesem Bereich. **B UV/Vis-Spektrum.** Das UV/Vis-Spektrum zeigt ein für (*E*)-Phenylitaconat typisches zweites Absorptionsmaximum bei 270 nm. **C Massenspektrometrie.** Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben eine Masse von 204,9 Da, die gut mit der erwarteten Masse von 205 Da des einfach deprotonierten (*E*)-Phenylitaconats übereinstimmt.

**Synthese von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA.** (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde über das Säureanhydrid hergestellt. Dazu wurden äquimolare Mengen (*E*)-Phenylitaconat und Essigsäureanhydrid in Essigsäure gelöst und auf 120°C erhitzt. Bei dieser Temperatur verdampft sowohl die Essigsäure, die als Lösungsmittel eingesetzt wurde, als auch diejenige, die durch Umsetzung des (*E*)-Phenylitaconats mit dem Essigsäureanhydrid gebildet wird. Das entstandene (*E*)-Phenylitaconsäureanhydrid liegt nach der Synthese als Reinsubstanz vor. Das Anhydrid wurde dann feingemörst und zur CoA-Thioester-Synthese nach Schachter und Taggart (1976) eingesetzt. Nach Reaktionsende wurde der Ansatz mit HCl angesäuert und die nicht umgesetzte freie Säure mit Diethylether entfernt. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert und via HPLC und UV/Vis-Spektroskopie auf Reinheit untersucht. Die Ausbeute der Synthese lag bei 50 % ± 5 %.

**Analyse des synthetisierten (*E*)-Phenylitaconyl-CoA.** Das UV/Vis-Spektrum des (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zeigte Maxima bei 210 und 260 nm, die für CoA-Thioester übliche Schulter bei 232 nm und ebenso eine charakteristische Schulter bei 290 nm, die auf die C-C-Doppelbindung des Thioesters zurückgeführt wird, die in Konjugation zur Carbonylgruppe steht (Leutwein, 2002). (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde ebenfalls mittels HPLC untersucht. Es eluierte bei einem Acetonitrilgradienten von 3-20 % in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer über 30 min nach 5,2 min (Abb. 6). Zudem waren im HPLC-Elutionschromatogramm nicht umgesetztes freies CoA, Verunreinigungen des zur Synthese eingesetzten CoA und freies (*E*)-Phenylitaconat zu erkennen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von C. Leutwein (2000) überein. Das synthetisierte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde schließlich auch mittels HPLC-MS analysiert. Die Auftrennung erfolgte auf einer C18-Säule in 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonat (pH 8,5) mit einem linearen Acetonitrilgradienten von 0-10 % in 10 Minuten. Der vermutete Peak von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde direkt in dem an die HPLC-Anlage gekoppelten Massenspektrometer untersucht und zeigte eine Molekülmasse von 954,1 Da. Dieser Wert stimmt gut mit den erwarteten 954,7 Da von einfach deprotonierten (*E*)-Phenylitaconyl-CoA überein.



**Abb. 6: Produktanalyse nach Synthese von (E)-Phenylitaconyl-CoA. A HPLC-Chromatographie.** Das Syntheseprodukt wurde mittels „reversed phase“-Chromatographie analysiert. Bei einem Acetonitril-Gradienten von 3-20 % in 30 min eluierte nach 4,5 min freies CoA, das bei der Synthese nicht umgesetzt wurde und nach 5,2 min (E)-Phenylitaconyl-CoA. **B UV/Vis-Spektrum.** Die Abbildung zeigt das Spektrum von freiem CoA im Vergleich mit synthetisiertem (E)-Phenylitaconyl-CoA. Das Spektrum von (E)-Phenylitaconyl-CoA hat die für CoA-Thioester übliche Schulter bei 232 nm. Außerdem weist das Spektrum die für (E)-Phenylitaconyl-CoA charakteristische Absorption bei 290 nm auf. **C Massenspektrometrie.** Das Produkt der (E)-Phenylitaconyl-CoA-Synthese wurde mittels HPLC-MS analysiert. Es wurde eine Masse von 954,1 Da detektiert, was gut mit der erwarteten Masse von 954,7 Da von deprotonierten (E)-Phenylitaconyl-CoA übereinstimmt.

### 1.1.3 Reinigung der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Rekombinante (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde in *E. coli* überproduziert und über zwei Chromatographieschritte gereinigt. Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Da die ersten beiden Enzyme des  $\beta$ -Oxidationswegs als nicht sensitiv gegenüber Sauerstoff bekannt waren (Leutwein, 2000), wurden die Versuche unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Ein typischer Reinigungsgang ist in Tabelle 5 dargestellt. Aus 8,3 g Zellen (720 mg lösliches Gesamtprotein) wurden 20 mg gereinigte (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase erhalten. Damit macht die (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase mindestens 2,7 % des löslichen Gesamtproteins aus. Die gemessene spezifische Enzymaktivität in *E.coli*-Rohextrakt wird vermutlich durch darin enthaltene CoA-Thioesterasen, die ebenfalls zu einer Absorptionsabnahme bei 290 nm führen, erhöht. Die spezifische Enzymaktivität von *E.coli*-Rohextrakt ohne überproduzierte (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase lag bei  $80 \pm 5$  % des für *E.coli*-Rohextrakt mit überproduziertem Enzym gemessenen Wertes. Die für die Reinigung des Enzyms angegebenen Werte für Ausbeute

(16 %) und Anreicherungsfaktor (8,7) beziehen sich auf die apparente Aktivität, die im Rohextrakt mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bestimmt wurde. Die tatsächliche Ausbeute und Anreicherung liegen wegen der Thioesterase-Hintergrundaktivität vermutlich höher. Abbildung 7 zeigt ein typisches Reinigungsgel der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.

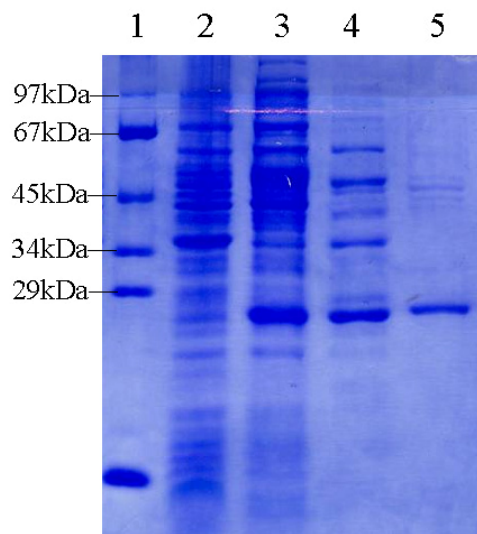
**Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose.** Zellextrakte von *E.coli*-Zellen mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurden auf eine DEAE-Sephrose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit einem linearen KCl-Gradienten in Grundpuffer eluiert. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte zwischen einer KCl-Konzentration von 75 mM und 125 mM in einem Volumen von 50 ml. Nach diesem Reinigungsschritt wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen, dass in der Proteinfraction keine CoA-Thioesterasen mehr vorhanden waren, die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu freiem CoA und (*E*)-Phenylitaconat hydrolysieren. Die spezifische Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase in dieser Fraction war  $21 \mu\text{mol min}^{-1}[\text{mg Protein}]^{-1}$ . Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde um den Faktor 3,5 angereichert und die Ausbeute betrug 43 % bezogen auf den Rohextrakt mit überproduziertem Protein.

**Chromatographie an keramischem Hydroxylapatit.** Ein Drittel des Eluats der DEAE-Säule (15 ml) wurde auf 50 ml verdünnt, so dass die Fraction eine Salzkonzentration von ungefähr 30 mM KCl hatte. Diese Proteinlösung wurde auf eine keramische Hydroxylapatit-Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0-100 mM Kaliumphosphat eluiert. Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eluierte in einem Volumen von 15 ml zwischen 30 mM und 40 mM Kaliumphosphat. Die spezifische Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase nach Chromatographie an keramischem Hydroxylapatit war  $52 \mu\text{mol min}^{-1}[\text{mg}^{-1} \text{ Protein}]$ . Nach diesem Schritt war das Enzym bei einer Ausbeute von 16 % um den Faktor 8,7 angereichert und erschien bis auf wenige Kontaminationen sauber.

**Tab. 5: Reinigungstabelle rekombinanter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.** Die in *E. coli*-Rohextrakt mit überproduzierter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gemessene spezifische Enzymaktivität wird vermutlich durch enthaltene CoA-Thioesterasen stark erhöht. Durch Chromatographie an DEAE-Sepharose wurden die CoA-Thioesterasen abgetrennt und die spezifische Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase konnte ohne Einfluss anderer Enzyme bestimmt werden.

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol min}^{-1} [\text{mg}^{-1}\text{Protein}]$ )	Anreicherung (fach)	Ausbeute (%)
Extrakt*	9	360	232	6	1	100
DEAE	90	57	99	21	3.5	43
Hydroxylapatit	50	37	37	52	8.7	16

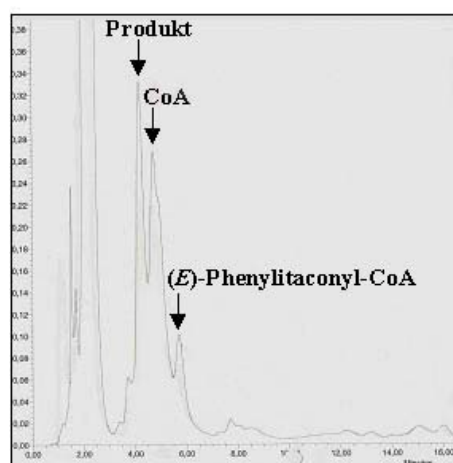
\*Aktivität von Thioesterasen + (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase



**Abb. 7: SDS-Reinigungsgel der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.** Die Fraktionen, die nach den einzelnen Chromatographieschritten die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase enthielten, wurden auf einem 12,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Spuren: (1) Standardproteine, (2) *E. coli*-Zellextrakt vor Induktion, (3) *E. coli*-Zellextrakt nach Induktion, (4) DEAE-Fraktion, (5) Hydroxylapatit-Fraktion. Die apparenten Massen der Standardproteine sind links gezeigt.

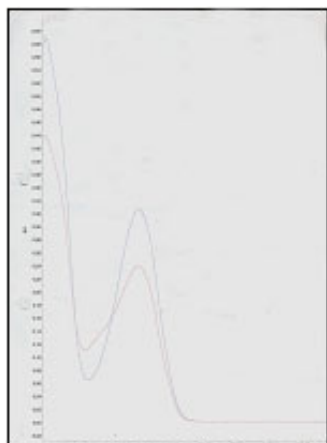
#### 1.1.4 Untersuchung des Produkts der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Reaktion

**HPLC-Chromatographie.** Nach Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA mit gereinigter(*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde der Ansatz via HPLC-Chromatographie untersucht. Dazu wurden die Proteine mit Säure gefällt und durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Metaboliten im Überstand wurden auf einer C18-Säule aufgetrennt. Es wurde ein neuer Peak entdeckt, der nach 3,7 Minuten eluierte und abhängig von der Anwesenheit der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase war (Abb.8). Das im Ansatz enthaltene freie CoA stammt aus dem eingesetzten selbst synthetisierten Substrat, das neben (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu etwa gleichen Anteilen nicht umgesetztes freies CoA enthält. (Ergebnisse 1.1.2).



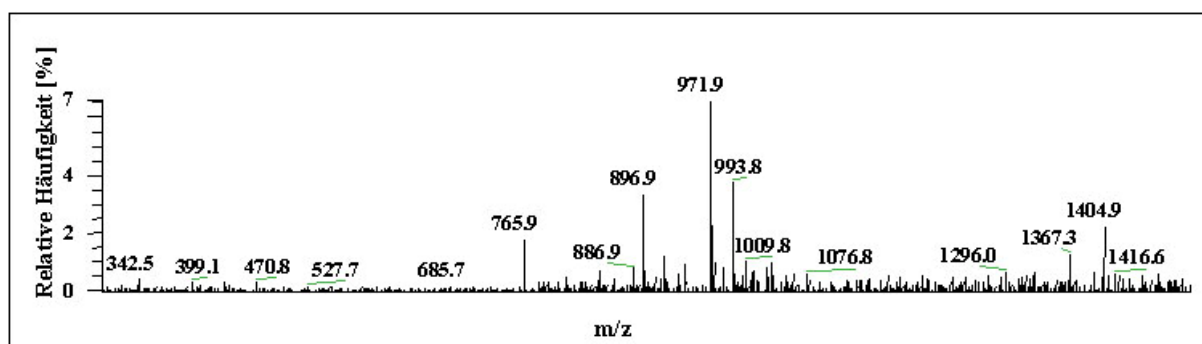
**Abb. 8: HPLC-Chromatographie des Produkts der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase -Reaktion.** (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde mit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase umgesetzt. Die Reaktion wurde mit Säure gestoppt und nach Entfernen der Proteinfraktion der Überstand mittels HPLC analysiert. Bei einem linearen Gradienten von 3-20 % ACN in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,6 eluierte nach 3,7 min ein Produktpeak.

**UV/Vis-Spektrum.** Das UV/Vis-Spektrum des Produkts der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde während eines HPLC-Laufes durch einen Diodenarray-Detektor aufgenommen. Das Spektrum zeigt im Vergleich zu freiem CoA eine höhere Absorption bei 232 nm, was ein charakteristisches Merkmal für CoA-Thioester ist. Desweiteren wurden die für die Verbindung erwarteten Absorptionsmaxima bei 210 und 260 nm detektiert (Abb. 9). Die Verbindung zeigt allerdings im Vergleich zu (*E*)-Phenylitaconyl-CoA keine Absorption bei 290 nm mehr, was für die Auflösung der Doppelbindung durch Addition von Wasser spricht.



**Abb. 9: UV/Vis-Spektrum des Produkts der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.** Die Abbildung zeigt das Spektrum von freiem CoA im Vergleich mit dem Produkt der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Das Spektrum zeigt für CoA-Thioester typische Charakteristika wie die Absorptionsmaxima bei 210 und 260 nm sowie eine Schulter bei 232 nm.

**Masse des Produkts der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.** Der Überstand einer säuregefällten Umsetzung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA mit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde über HPLC-MS analysiert. Das Produkt der enzymatischen Umsetzung hatte eine Molekülmasse von 971,9 Da (Abb. 10), die gut mit der erwarteten Molekülmasse von einfach deprotoniertem (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA von 972,7 Da übereinstimmt.



**Abb. 10: Massenspektrum des Produkts der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.** (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wurde mit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase umgesetzt. Nach Beenden der Reaktion wurde der Ansatz mittels HPLC-MS analysiert. Die Abbildung zeigt das Massenspektrum des vermuteten Produktpeaks. Die Masse von 971,9 Da stimmt gut mit der Masse von 972,7 von deprotoniertem (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA überein.



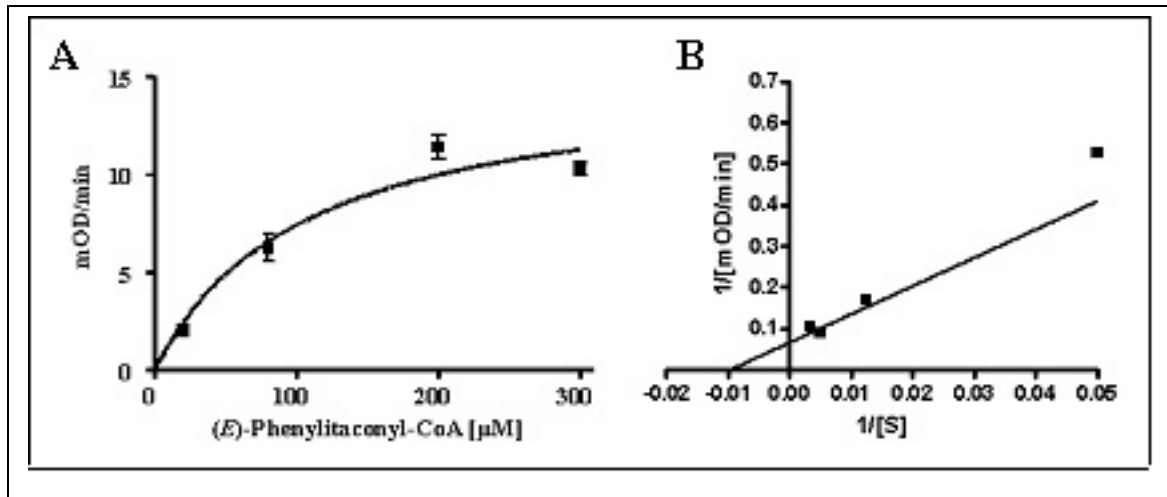
### 1.1.5 Biochemische Charakterisierung der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

**Sequenzierung des N-Terminus.** Gereinigte (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde nach Chromatographie an Hydroxylapatit auf eine PVDF-Membran transferiert und N-terminal ansequenziert (Hr. Brunisholz, ETH Zürich). Das Resultat der Sequenzierung war identisch mit der erwarteten Aminosäureabfolge (PVTLFV). Rekombinante (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase hat wie die native (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase aus *T. aromatica* kein endständiges Methionin (Leuthner and Heider, 2000).

**Bestimmung der apparenten Molekülmasse des nativen Enzyms.** Die apparente Molekülmasse der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde durch Chromatographie einer Hydroxylapatitfraktion an einer Superdex-200-HR-Gelfiltrationssäule bestimmt. Die native Masse der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde auf 118 kDa +/- 7 kDa bestimmt, was bei einer Untereinheit von 28 kDa eine  $\alpha_4$ -Komposition des Enzyms nahelegt.

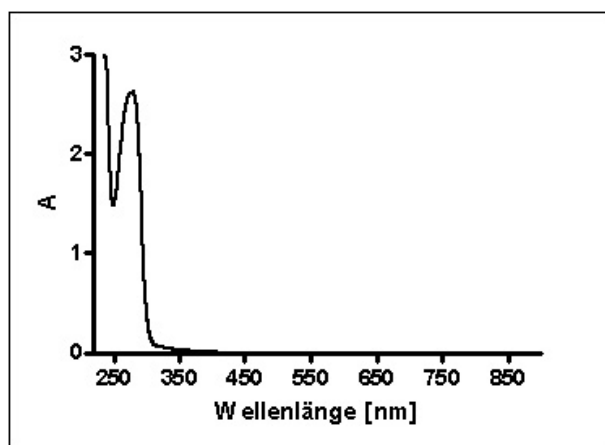
**Reaktionskinetik und Inhibition.** (E)-Phenylitaconyl-CoA wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: 20  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 200  $\mu$ M sowie 300  $\mu$ M. Nach Zugabe der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde die Absorptionsabnahme bei 290 nm gemessen. Dabei wurde ein Wert von 47,5  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> [mg<sup>-1</sup> Protein] für  $V_{\max}$  ermittelt. Der apparente  $K_m$ -Wert der (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase für (E)-Phenylitaconyl-CoA wurde auf 104 +/- 34  $\mu$ M bestimmt (Abb.11).

Die Aktivität der Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde durch den Zusatz von 2 mM EDTA zum Puffer nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die Enzymaktivität unabhängig von zweiwertigen Metallen ist.



**Abb. 11: Messung der Enzymaktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bei unterschiedlichen Substratkonzentration zur Ermittlung des  $K_m$ -Wertes.** Es wurden jeweils 20  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  (*E*)-Phenylitaconyl-CoA in den Enzymtest eingesetzt und die Absorptionsabnahme bei 290 nm bestimmt. **A** Darstellung nach Michaelis-Menten. **B** Lineweaver-Burk-Diagramm.

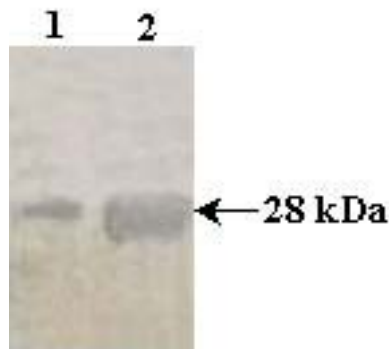
**UV/Vis-Spektrum.** Von gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde ein UV/Vis-Spektrum in einem Bereich von 200 – 600 nm aufgenommen (Abb. 12). Es ist ein Absorptionspeak bei 280 nm zu erkennen, der bedingt ist durch die im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren. Weitere Absorptionsmaxima sind nicht zu erkennen. Daraus lässt sich ableiten, dass die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase ähnlich wie die meisten anderen Enoyl-CoA Hydratasen keine absorbierenden Kofaktoren enthält. Der experimentell bestimmte Extinktionsfaktor des Enzyms liegt bei  $22440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dieser Wert stimmt hinreichend mit dem aus dem Tryptophan- und Tyrosingehalt der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase errechneten Extinktionskoeffizienten überein ( $25440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



**Abb. 12: UV/Vis-Spektrometrie mit gereinigter (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.** Das Enzym lag in 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl vor (Proteinkonzentration:  $3,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ); das Spektrum wurde gegen den gleichen Puffer aufgenommen.

### 1.1.6 Produktion von Antikörpern gegen die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Die Gewinnung von Antikörpern gegen die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde durch die Firma Bioscience (Göttingen) durchgeführt, die dafür 1 ml gereinigtes Enzym (nach Chromatographie an Hydroxylapatit; Proteinkonzentration: 2 mg ml<sup>-1</sup>) zur Immunisierung eines Kaninchens einsetzte. Mit dem erhaltenen Antiserum wurde die Induktion der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase in *T. aromatica* untersucht. Hierzu wurden Extrakte von Zellen, die mit Toluol als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren, auf SDS-Polyacrylamid-Gelen getrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde eine Immunreaktion („Western-Blot“) mit Kaninchen-Anti-(*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase-Serum durchgeführt (Abb. 13). Dabei wurde ein Protein mit einer apparenten Molekularmasse von 28 kDa identifiziert. Mit dem Antiserum gibt es nun ein sensitives Nachweis-System für die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase.

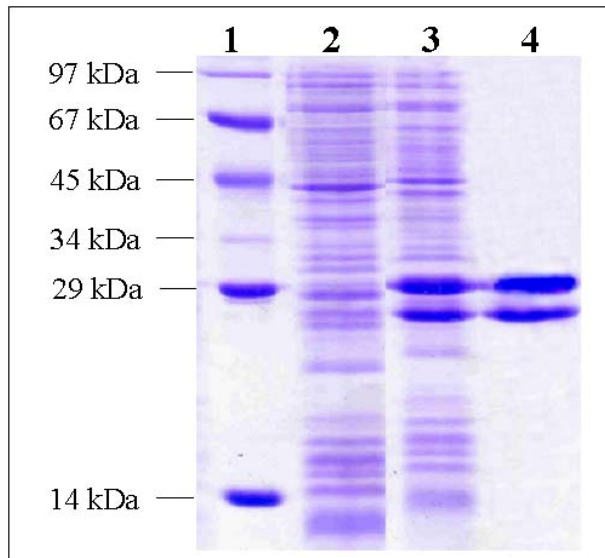


**Abb. 13: Immunreaktion mit Kaninchen-Antiserum gegen die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. 1- Zellextrakt von *T. aromatica*, die anaerob auf Toluol gewachsen sind. 2- Gereinigte, rekombinante (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. Die Proben wurden auf einem 12,5%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit verstärkter Chemolumineszenz.**

## 1.2 Reinigung und Charakterisierung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase

Im *bbs*-Operon von *T. aromatica* wurden zwei Gene (*bbsC* und *bbsD*) gefunden, deren Produkte zu 34 % zueinander identisch sind und jeweils eine hohe Sequenzhomologie zu kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen besitzen (Leuthner, 1999). Beide Gene wurden unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promoters in einen Überexpressionsvektor kloniert (Leuthner, 1999). Ebenso wurde bereits früher ein Reinigungsprotokoll für das heterolog überproduzierte Protein etabliert, allerdings ohne Aktivität messen zu können (Hermuth, Doktorarbeit 2002). Das Substrat des Enzyms ist kommerziell nicht erhältlich und durch einfache chemische Synthesen nicht zugänglich. Deshalb wurde versucht, die Enzymaktivität der vermuteten Alkoholdehydrogenase an die bereits nachgewiesene Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu koppeln.

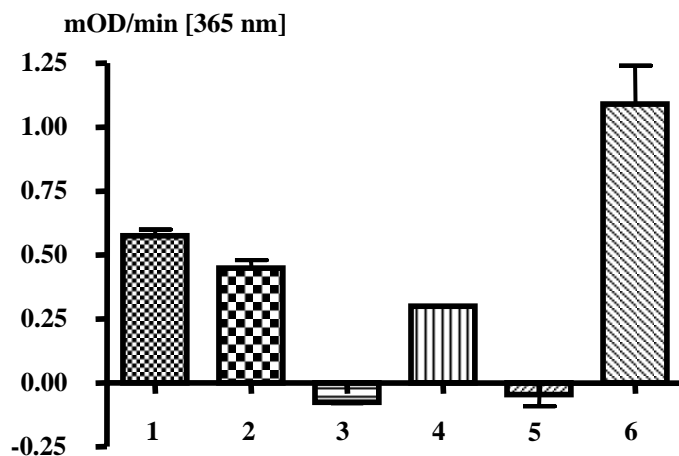
**Reinigung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase.** Heterolog überproduzierte (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase wurde in einem Chromatographieschritt aus *E. coli* gereinigt. Als Reinigungskriterium wurde die Anreicherung des Enzyms über SDS-PAGE verfolgt. Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Wie bei den übrigen Enzymen der  $\beta$ -Oxidation ist auch bei der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase keine Sensitivität gegenüber Sauerstoff zu erwarten. Aus 6,3 g Zellen (325,5 mg lösliches Gesamtprotein) wurden 8,8 mg gereinigtes Protein erhalten. Damit macht das Enzym mindestens 2,7 % des löslichen Gesamtproteins aus. Abbildung 14 zeigt ein typisches Reinigungsgel der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase. Zellextrakte von *E.coli*-Zellen mit überproduziertem Enzym wurden auf eine DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit einem linearen KCl-Gradienten im Grundpuffer eluiert. Das Enzym eluierte bei einem Salzgehalt von 40 mM-100 mM KCl in einem Volumen von 67,5 ml und war nach dem ersten Reinigungsschritt fast zu 100 % sauber.



**Abb. 14: 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase.** 1- Proteinstandard. 2- *E.coli*-Zellextrakt vor Induktion. 3- *E.coli*-Zellextrakt nach Induktion. 4 - (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase nach Chromatographie an DEAE-Sepharose.

**Photometrischer Enzymtest mit Messung der NAD-Reduktion.** In diesen Test wurden 0,5 mM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, 2 mM NAD und variierende Konzentration der beiden gereinigten Enzyme (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase und (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eingesetzt. Die Absorption von NADH wurde bei 365 nm verfolgt ( $\epsilon = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Da wir vermuteten, dass die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase eine deutlich größere spezifische Aktivität besitzt als die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase, wurde letztere in zwei- bis fünffachem Überschuss eingesetzt. Das (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA, das durch die Hydratase aus (*E*)-Phenylitaconyl-CoA gebildet wird, sollte dabei durch die Dehydrogenase mit NAD als Elektronenakzeptor zu Benzoylsuccinyl-CoA oxidiert werden. Tatsächlich wurde eine (*E*)-Phenylitaconyl-CoA-abhängige NAD-Reduktion in Ansätzen mit zugesetzter (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase detektiert. Eine Absorptionszunahme bei 365 nm wurde allerdings auch in Kontrollansätzen ohne (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase beobachtet (Abb. 15). Ein Kontrollexperiment bei dem (*E*)-Phenylitaconyl-CoA nur mit der Dehydrogenase versetzt und die Absorption bei 295 nm gemessen wurde, zeigte ebenfalls eine starke Absorptionsabnahme (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die gereinigte (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase noch Spuren einer unspezifischen Hydratase aus *E.coli* enthält. Die Reduktion von NAD, der im gekoppelten Enzymtest zu beobachten war, ist damit auf die Aktivität der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase zurückzuführen. Die schwache Zunahme der Absorption bei 365 nm in diesem Testansatz wurde durch Zugabe von Phenylhydrazin stark gesteigert (Abb. 15). Dieser

Effekt kann damit erklärt werden, dass Phenylhydrazin mit dem entstehenden Benzoylsuccinyl-CoA zu einem Hydrazon umgesetzt wird und so das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschoben wird.



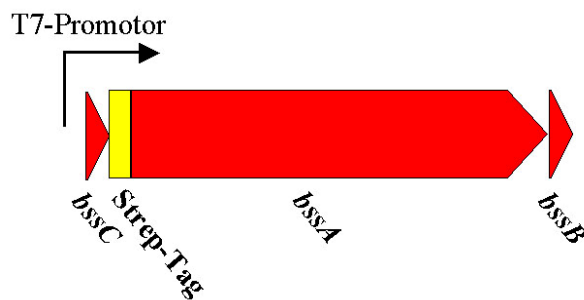
**Abb. 15: Photometrischen Messung der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase-Aktivität in einem an die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gekoppelten Test.** Die Messung erfolgte bei 365 nm, um die (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase-abhängige NADH-Produktion zu verfolgen. Die Ansätze in 50 mM Mes-Puffer pH 6,2 enthielten: 2,5 µl (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (4,6 mg ml<sup>-1</sup>), 7,5 µl (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase (10 mg ml<sup>-1</sup>), 0,4 mM NAD und 0,2 mM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA. In den einzelnen Ansätzen wurden verschiedene Komponenten weggelassen oder hinzugefügt. **1**enthält alle aufgeführten Substanzen. **2** ohne (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase. **3** ohne (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase. **4** ohne NAD. **5** 0,2 mM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA ohne Enzyme. **6** kompletter Ansatz mit zusätzlich 0,4 mM Phenylhydrazin. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Reader bei Raumtemperatur.

**Diskontinuierlicher Enzymtest.** Reaktionsansätze mit 1 mM (*E*)-Phenylitaconyl-CoA, 2 mM NAD und den beiden Enzymen (*E*)-Phenylitaconyl-CoA und (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mit Säure gestoppt. Die Überstände wurden nach Abtrennen der Proteinfraction auf einer C18-Säule via HPLC auf die Bildung von Benzoylsuccinyl-CoA untersucht. Da es bislang keine zuverlässigen Daten zum Verhalten von Benzoylsuccinyl-CoA bei „reversed phase“ HPLC gibt, wurde generell nach Abnahme des Substratpeaks und Entstehung eines Produktpeaks analysiert. Nach den Ergebnissen der photometrischen Tests war anzunehmen, dass nur sehr geringe Benzoyl-CoA gebildet wurden. Die HPLC-Analyse der Umsetzungen von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA mit beiden Enzymen zeigte keinen neuen Produktpeak, der Benzoylsuccinyl-CoA zugeordnet werden kann. Die gebildete Menge an Benzoylsuccinyl-CoA ist damit vermutlich zu gering um mittels HPLC detektiert zu werden.

## 2. Untersuchungen an der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

### 2.1 Klonierung

Das Gen der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde von Joachim Hogg als Strep-Tag-Fusion in den Vektor pCR-Script (Amp) kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die drei Gene, die für die Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase codieren stehen dabei unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Der Strep-Tag befindet sich am N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit (Abb.16). Im folgenden wird das Translationsprodukt des Konstrukts als (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bezeichnet.

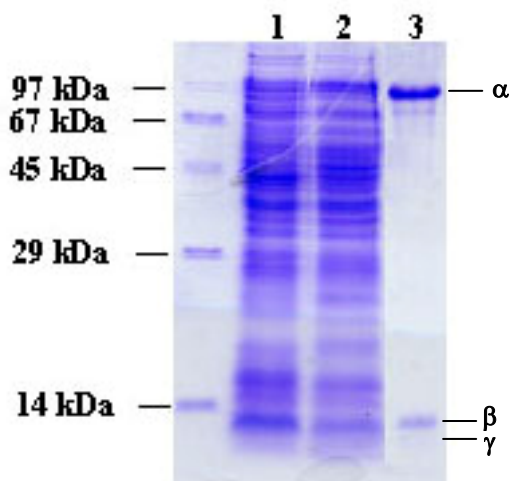


**Abb. 16: Genetische Organisation der rekombinanten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase .** Die drei Gene der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase stehen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die  $\alpha$ -Untereinheit wird als Strep-Fusionsprotein exprimiert.

### 2. 2 Reinigung über Affinitätschromatographie

Heterolog in *E.coli* BL-21 überproduzierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde zunächst über zwei Chromatographieschritte gereinigt. Das Protein wurde dabei zuerst über Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephrose angereichert und anschließend durch Affinitätschromatographie an Strep-Tactin Superflow-Material gereinigt. Während meiner Arbeit stellte sich heraus, dass die Anreicherung über Ionentauschchromatographie nicht nötig ist und die Affinitätschromatographie für die Reinigung des Proteins ausreicht, wenn die Säule nach Beladen mit Rohextrakt mit drei Säulenvolumina Hochsalzpuffer (0,5 M NaCl, 10 mM Triethanolamin pH 8,0) gewaschen wird. Das Enzym blieb dabei intakt und eluierte mit 99 %iger Reinheit (Abb. 17). Das neue Reinigungsprotokoll erlaubt die

Gewinnung reiner (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in kürzerer Zeit, wobei die Ausbeute sich gegenüber dem bisherigen Verfahren nicht änderte. Aus 1 g Feuchtmasse überproduzierender *E. coli*-Zellen erhält man 1 mg reine (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase .



**Abb. 17: Reinigungsgel der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase . 1-** Proteinstandard. **2-** *E.coli* Zellextrakt vor Induktion. **3-** *E.coli*-Zellextrakt nach Induktion. **4-** Eluat nach Affinitätschromatographie.

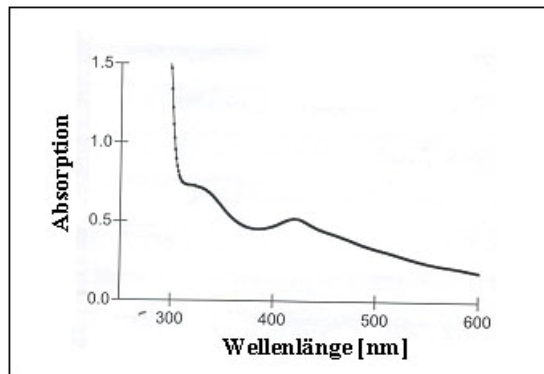
## 2. 3 UV/Vis-Spektrometrie und Elementaranalyse der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Von gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (1,4 mg/ml) wurde ein UV/Vis-Spektrum in einem Bereich von 200 – 600 nm aufgenommen. Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 280 nm, eine Schulter im Bereich von 320 nm und ein weiteres kleineres Maximum bei 410 nm (Abb. 18). Die Absorption im sichtbaren Bereich des Spektrums weist darauf hin, dass die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase weitere Kofaktoren enthält. Das Spektrum des gereinigten rekombinanten Enzyms entspricht dem des gereinigten, inaktiven Enzyms aus *T. aromatica* (Hermuth, Doktorarbeit 2002). Die rekombinante (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase besitzt demnach vermutlich die gleichen Kofaktoren wie das native Enzym.

Eine Elementaranalyse (Chemical Analysis Laboratory der Universität Georgia, USA) ergab, dass in der gereinigten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase 6 Eisenatome pro Holoenzym enthalten sind. Andere Metalle wurden durch die Elementaranalyse nicht gefunden. Eine kolorimetrische Bestimmung des Gehalts an säurelabilem Schwefel (Methode nach Beinert *et al.*, 1983) von gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase ergab 9 – 11 Schwefelatome pro Holoenzym (J. Hogg, persönliche Mitteilung).



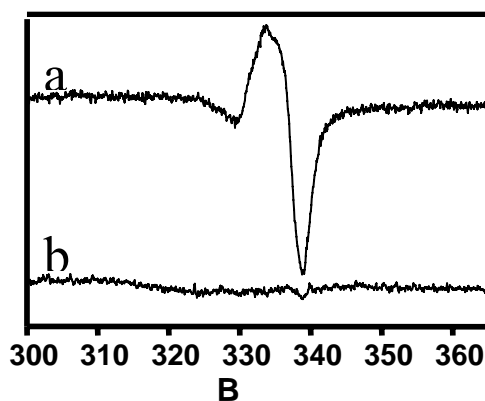
Die Absorptionseigenschaften des Enzyms werden also sehr wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Fe-S-Cluster bestimmt.



**Abb. 18: UV/Vis-Spektrum gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase.** Das Enzym lag in einer Konzentration von 1,4 mg/ml in 160 mM NaCl, 10 mM Triethanolamin pH 8,0 vor. Das Spektrum wurde gegen Puffer ohne Protein aufgenommen.

## 2.4 Elektronenspinresonanz-Analyse der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Die Kofaktoren in gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurden mittels Elektronenspinresonanz-Analyse (ESR) genauer charakterisiert. Dazu wurde gereinigtes und ankonzentriertes (7-8 mg/ml), aber nicht weiter behandeltes Enzym eingesetzt. Die Proben zeigten dabei bei Temperaturen unterhalb von 30 K deutliche ESR-Signale (Abb. 19 A).



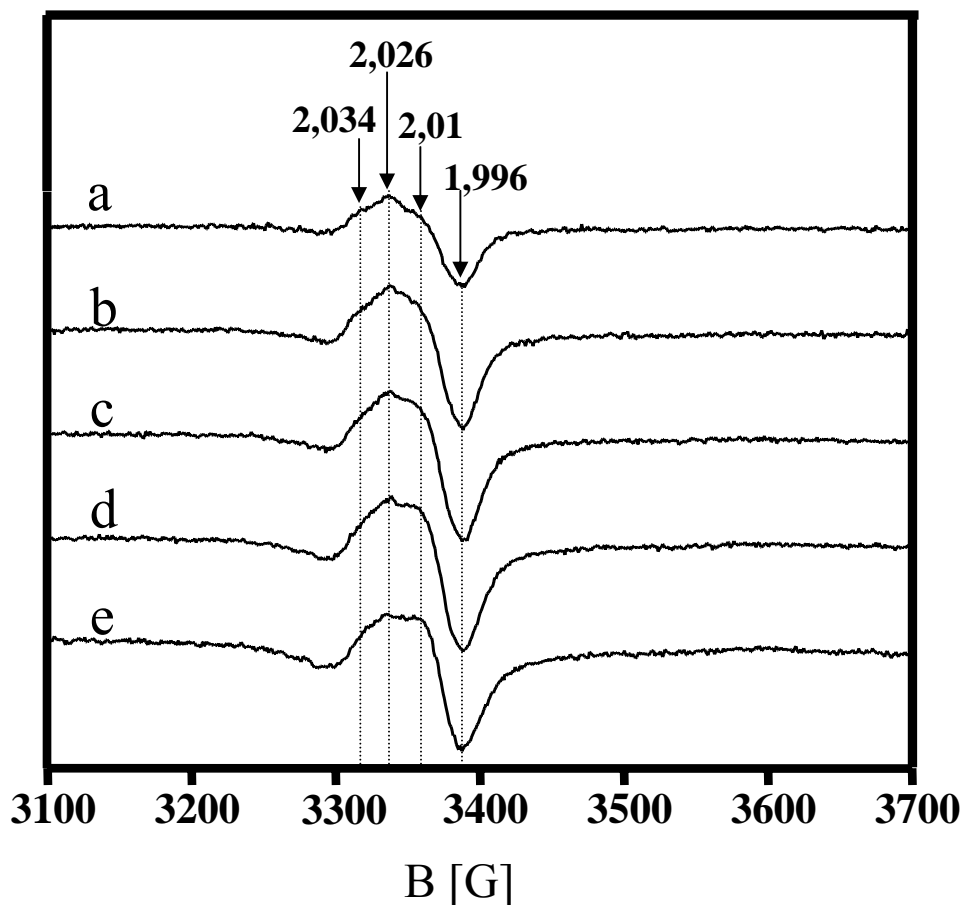
**Abb. 19: ESR-Spektrum der gereinigten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase . A- unbehandelt. B- reduziert mit 1 mM Dithionit.** In reduziertem Zustand verschwindet das ESR-Signal fast komplett. Dieses Verhalten ist charakteristisch für  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster, die nur in oxidiertem Zustand ESR-aktiv sind. Die Daten wurden unter den folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 mW, 10 K (A) bzw. 20 K (B), 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude.

Wurde das Enzym vor der ESR-Analyse mit 1 mM Dithionit reduziert, verschwand das Signal (J. Hogg; Abb. 19 B). Dieses Verhalten ist charakteristisch für  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster, die nur in oxidiertem Zustand ESR-aktiv sind. Zusammen mit den Ergebnissen der Elementaranalyse (2.3), nach der jedes Holoenzym 6 Eisenatome enthält, vermuten wir deshalb zwei  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster in der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um ein oder mehrere Fe-S-Cluster handelt, wurden Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen und Mikrowellenleistungen durchgeführt.

#### 2.4.1 Temperaturabhängigkeit

Die ESR-Signale gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase waren nur bei Temperaturen unterhalb von 30 K sichtbar, was gut mit den erwarteten Spin-Relaxations-Eigenschaften von  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Clustern übereinstimmt. ESR-Analysen, die bei unterschiedlichen Temperaturen (10 – 40 K) durchgeführt wurden, zeigten, dass mit zunehmender Temperatur die Intensität des Signals schwächer wurde und schließlich ganz verschwand. Dabei veränderte sich die Gestalt des Signals allerdings nicht. Die Resonanzen werden durch die unterschiedliche Temperatur in gleicher Weise beeinflusst, wodurch eine Differenzierung zwischen den beiden postulierten Fe-S-Zentren nicht möglich ist. Da über die Temperaturabhängigkeit der ESR-Signale keine Aussagen getroffen werden konnte, wurde zusätzlich noch das Verhalten der Spektren bei Änderung der Mikrowellen-Leistung untersucht („Power saturation“, Abb.20).

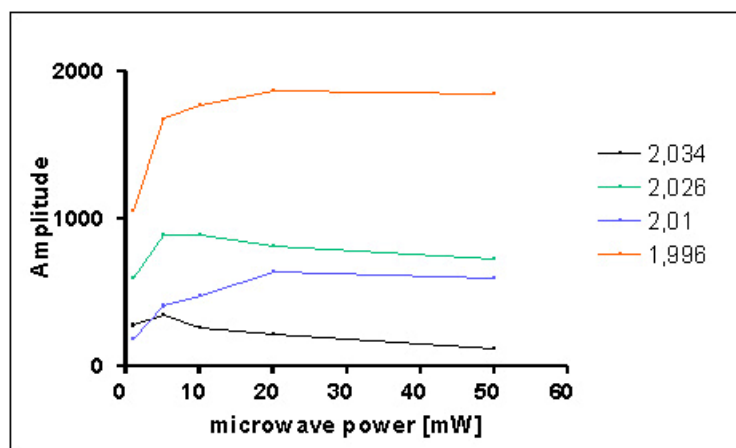
### 2.4.2 Sättigungsverhalten der Spektren bei Steigerung der Mikrowellen-Leistung



**Abb. 20: ESR-Spektrum gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bei 10 K und unterschiedlicher Mikrowellenleistung. a 1mW. b 5mW. c 10mW. d 20mW. e 50mW.** Die Daten wurden unter den folgenden Bedingungen aufgenommen: 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude.

Diese Messungen wurden mit gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bei 10 K durchgeführt. Die Daten aus dieser Analyse zeigten Unterschiede der Amplitudenwerte bei bestimmten  $g$ -Werten in Abhängigkeit von der Mikrowellenleistung. Die Resonanzen bei  $g = 2.026$  und  $g = 2.034$  sind schon bei einer relativ schwachen Mikrowellenleistung von 5 mW gesättigt, während das Signal bei  $g = 2.010$  erst bei relativ hoher Mikrowellenleistung (20 mW) gesättigt ist. Das Signal bei  $g = 1.996$  zeigt zunächst eine steile Zunahme bis zu einer Mikrowellenleistung von 2 mW, danach eine langsamere, die bei 20 mW gesättigt ist (Fig. 21). Daraus kann man folgern, dass die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zwei unterschiedliche  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster enthält, die bei unterschiedlichen Mikrowellenleistungen gesättigt werden, aber wahrscheinlich beide eine ESR-Resonanz bei  $g = 1.996$  hervorrufen. Aufgrund dieser

Daten kann man einem der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster die ESR-Resonanzen bei  $g = 2.01$  und  $1.996$ , dem anderen diejenigen bei  $g = 2.026$  und  $2.034$  und  $1.996$  zuordnen.



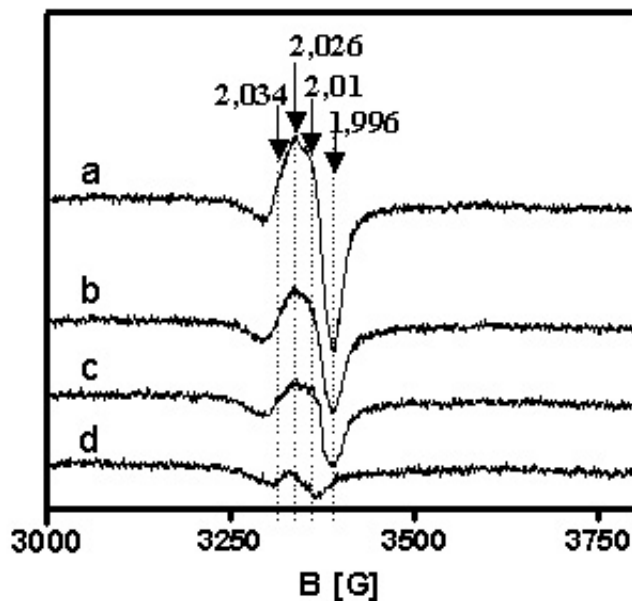
**Abb. 21: Amplitudenwerte der  $g$ -Werte in Abhängigkeit der Mikrowellenleistung.** Die Amplitudenwerte verschiedener  $g$ -Werte der oben gezeigten ESR-Analyse (Abb.20) sind abhängig von der applizierten Mikrowellenleistung dargestellt. Die Resonanz bei  $g = 1,996$  wird wahrscheinlich durch beide  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster hervorgerufen, die Resonanzen bei den anderen  $g$ -Werten jeweils nur durch ein  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster.

### 2.4.3 Spinquantifizierung

Mit gereinigter, unbehandelter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde eine Spinquantifizierung des erhaltenen ESR-Signals durchgeführt. Die Probe wurde dabei bei einer Temperatur von 10 K und einer Mikrowellenleistung von 2 mW gemessen. Als Standard wurde eine Lösung von 1 mM  $\text{CuSO}_4$  in 1 mM EDTA und 10 mM HCl eingesetzt. Die Spinquantifizierung ergab bei zwei unterschiedlichen Präparationen gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase übereinstimmende Werte von  $0,90 \pm 0,04$  Spins pro  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Holoenzym. Dieses Ergebnis legte also nahe, dass nur ein  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster pro Holoenzym vorhanden ist. Dies erscheint zunächst widersprüchlich zur Analyse des Eisengehalts (Ergebnisse 2.3) und den "Power saturation"-Studien, die für die Anwesenheit zweier unterschiedliche  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren sprechen (Ergebnisse 2.4.2). Die Daten können allerdings erklärt werden, wenn man annimmt, dass jeweils nur einer der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase im oxidierten Zustand vorliegt, während der zweite reduziert und damit ESR-still ist.

#### 2.4.4 Einfluss von Inhibitoren auf das ESR-Spektrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Die Enzymaktivität der nativen (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wird nicht nur durch Sauerstoff sondern auch durch andere niedermolekulare Substanzen wie Kohlenstoffmonoxid (CO), Cyanid und Stickstoffmonoxid (NO) inhibiert (Verfürth, Doktorarbeit 2004). Inkubation mit Sauerstoff bewirkte dabei eine Auslöschung des Glycyl-Radikalsignals im ESR-Spektrum, während CO und Cyanid keinen Einfluss auf das Radikalsignal hatten. Deshalb wurde vermutet, dass diese Inhibitoren mit den  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Clustern der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase interagieren und möglicherweise dadurch die Enzymaktivität verringern. Gereinigte inaktive (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde deshalb mit Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert, die das aktive Enzym im Rohextrakt aus *T. aromatica* komplett inhibieren (25  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ , 140  $\mu\text{M}$  CO bzw. 500  $\mu\text{M}$  Cyanid) und anschließend mittels ESR-Spektroskopie untersucht (Abb. 22).



**Abb. 22: ESR-Spektrum gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach Inhibitorinkubation.** A- unbehandelt. B- 25  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ . C-140  $\mu\text{M}$  CO. D-500  $\mu\text{M}$  Cyanid. Durch  $\text{O}_2$  verändert sich die Gestalt des ESR-Signals im Vergleich zur unbehandelten Probe nicht. Nach Inkubation mit Cyanid verschwindet das Signal fast komplett. Die Daten wurden unter den folgenden Bedingungen aufgenommen: 10 mW, 10 K, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude.

Sauerstoff bewirkte eine Verringerung des gesamten ESR-Signals. Die verschiedenen Resonanzen wurden dabei in gleichem Maße verringert, so dass sich die Gestalt des ESR-Signals insgesamt nicht veränderte. CO und Cyanid beeinflussten dagegen sowohl die

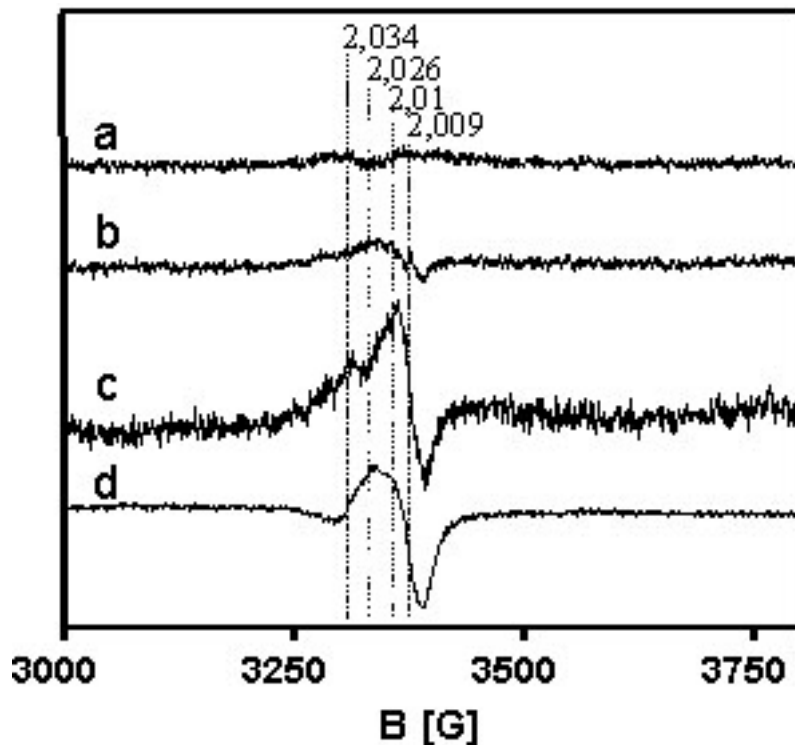
Intensität als auch die Gestalt des ESR-Signals gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (Abb. 22). Um die betroffenen Resonanzen deutlicher darzustellen, wurden Differenzspektren aus den Spektren von unbehandeltem und mit Inhibitor behandeltem Enzym erstellt. Da alle Spektren nach Inhibitorbehandlung gegenüber der unbehandelten Probe weniger stark waren, wurden sie vor der Verrechnung angeglichen. Dazu wurde zuerst der durch die Spinquantifizierung ermittelte Faktor eingesetzt und bei Bedarf weiter verändert. Für Cyanid-behandeltes Enzym stand kein Spinquantifizierungs-Wert zur Verfügung, so dass der Faktor hier empirisch ermittelt wurde.

Das Differenzspektrum des Sauerstoff-behandelten Enzyms ergab eine Nulllinie ohne signifikante Maxima, wenn das Spektrum mit einem Faktor von 1,4 multipliziert wurde (Abb. 23). Dies ist konsistent mit der Spinquantifizierung dieser Probe, die einen 1,5-fach erniedrigten Wert ergab im Vergleich zum unbehandelten Enzym. Sauerstoff reduziert also zwar die Intensität des ESR-Signals, bindet aber vermutlich nicht an oder in die Nähe der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster. Seine inhibitorische Eigenschaft beruht wahrscheinlich ausschließlich auf der Eliminierung des Radikals der aktivierten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase.

Das Differenzspektrum der mit Cyanid behandelten Probe zeigt, dass Cyanid vor allem Einfluss auf die Resonanzen  $g = 2,034$  und  $g = 2,01$  hat (Abb. 23). Die Werte der Messung mit Cyanid wurden zur Erstellung des Differenzspektrums mit dem Faktor 5 multipliziert. Cyanid interagiert dieser Analyse zur Folge offenbar mit den  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase.

Für das Differenzspektrum der mit CO behandelten Probe wurden die Werte mit 1,9 multipliziert. Unter diesen Bedingungen ist bei  $g = 2,009$  das Auftauchen eines neuen radikalähnlichen Signals zu beobachten (Abb. 23). Eine Spinquantifizierung der mit CO behandelten Probe ergab allerdings nur einen um den Faktor 1,3 erniedrigten Wert im Vergleich zum unbehandelten Enzym. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass ein Teil des CO an den  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren zu einem Formylradikal oxidiert wird. Damit würde zugleich das detektierte radikalähnliche Signal bei  $g = 2,009$  erklärt.

Die Inhibition der nativen (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch CO bzw. Cyanid wird somit nach den Ergebnissen dieser ESR-Analysen vermutlich durch Wechselwirkung mit den  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster verursacht.



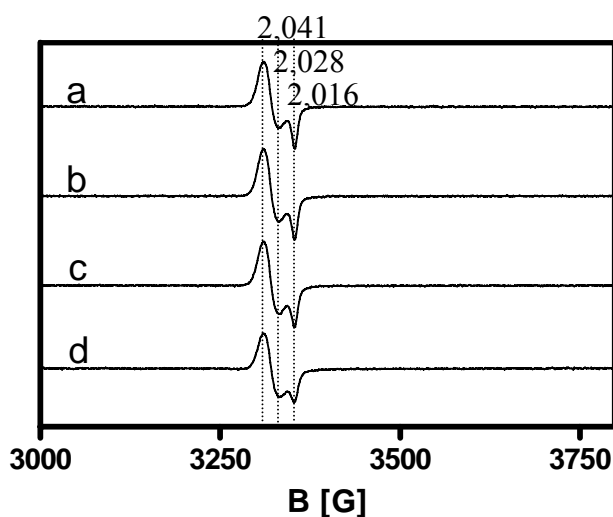
**Abb. 23: Differenzspektren gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus ESR-Analysen mit und ohne Inhibitorbehandlung im Vergleich mit dem Spektrum des unbehandelten Enzyms.** Die Differenzspektren wurden erstellt, indem das ESR-Spektrum gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor von dem Spektrum des unbehandelten Enzyms subtrahiert wurde. Die Daten wurden bei 10 K, 10 mW, 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz und 0,6 mT Modulationsamplitude aufgenommen. **A-** Differenzspektrum nach Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2$ . Die Werte der Messung nach Behandlung mit  $\text{O}_2$  wurden durch Multiplikation mit dem Faktor 1,4 angeglichen. **B-** Differenzspektrum nach Behandlung mit 140  $\mu\text{M}$  CO. Die Werte der Messung nach Behandlung mit CO wurden durch Multiplikation mit dem Faktor 1,9 angeglichen **C-** Differenzspektrum nach Behandlung mit 500  $\mu\text{M}$  Cyanid. Die Werte der Messung nach Behandlung mit Cyanid wurden durch Multiplikation mit dem Faktor 5 angeglichen. **D-** Originalspektrum gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase .

#### 2.4.5 Einfluss von NO auf das ESR-Signal gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Native (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in Rohextrakt aus *T. aromatica* wird durch Inkubation mit einer 280  $\mu\text{M}$  NO-Lösung komplett inhibiert (Verfürth, Doktorarbeit 2004). ESR-Analysen von mit NO behandelten inaktivierten Rohextrakt ergaben keine Auslöschung des Radikalsignals. Daher ist auch für NO anzunehmen, dass die Inhibition der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch Interaktion von NO mit den Fe-S-Clustern des Enzyms hervorgerufen wird. Um dies zu untersuchen wurde gereinigte, inaktive (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit 280  $\mu\text{M}$  NO inkubiert und anschließend mittels ESR-Spektroskopie analysiert

(Abb.24). Das erhaltene ESR-Signal unterscheidet sich stark in Gestalt und  $g$ -Werten vom ESR-Spektrum unbehandelter, gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Das veränderte ESR-Spektrum wird vermutlich durch die Bindung von NO in unmittelbarer Nähe der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Clustern an das Enzym hervorgerufen.

Um den Einfluss von NO auf die  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster des Enzyms genauer zu untersuchen, wurden ESR-Analysen mit NO behandelter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mit zunehmender Temperatur die Signale bei  $g = 2,016$  und  $g = 2,041$  ansteigen (Abb. 24). Die Resonanz bei  $g = 2,028$  wird dagegen durch zunehmende Temperatur nicht beeinflusst. Die Resonanzen bei  $g = 2,028$  und  $g = 2,016$  verhalten sich also bei steigender Temperatur unterschiedlich. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zwei unterschiedliche  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster enthält. Das Signal wurde auch bei höheren Temperaturen (bis 56 K) noch detektiert, was untypisch ist für  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster, die in unbehandeltem Zustand ESR-Signale bis zu einer Temperatur bis etwa 30 K liefern. Dies kann allerdings durch die Bindung des NO in die Nähe der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster erklärt werden, die eine langsamere Relaxation der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster bewirken könnten. Dadurch können auch bei höherer Temperatur ESR-Signale erhalten werden.



**Abb. 24: ESR-Analyse gereinigter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach Inkubation mit 280  $\mu\text{M}$  NO in Abhängigkeit von der Temperatur. a- 26 K. b- 20 K. c- 15 K. d- 10 K. Mit zunehmender Temperatur wird das Signal bei  $g = 2,016$  stärker. Die Daten wurden unter den folgenden Bedingungen aufgenommen: 9,46 GHz Mikrowellenfrequenz, 100 kHz Modulationsfrequenz, 0,6 mT Modulationsamplitude.**



## 2.5 Kristallisierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase

Gereinigte (R)-Benzylsuccinat-Synthase wurde für Kristallisationsansätze eingesetzt. Das Enzym wurde dazu im Elutionspuffer der Affinitätssäule (10 mM Triethanolamin, 2,5 mM Desthiobiotin, 160 mM NaCl pH 8,0) auf Konzentrationen zwischen 5 und 30 mg ml<sup>-1</sup> eingestellt.

### 2.5.1 Aerobe Kristallisationsansätze

Zu Beginn wurden aerobe Ansätze zur Kristallisierung sowohl im Microbatch-Verfahren unter Silikon- oder Paraffinöl-Überschichtung als auch mit der „sitting-drop“-Technik angefertigt. Bei diesen Ansätzen wurden allerdings erst nach langen Inkubationszeiten kleine amorphe Kristalle erhalten, die nicht für die Strukturaufklärung eingesetzt werden konnten. Da auch weitere Beobachtungen beim Arbeiten mit (R)-Benzylsuccinat-Synthase darauf hindeuteten, dass das Enzym auch im nicht-aktivierten Zustand bei längerer Inkubation in oxischen Puffern instabil ist, wurde die Kristallisation von (R)-Benzylsuccinat-Synthase dann nur noch unter strikt anaeroben Bedingungen versucht.

### 2.5.2 Anaerobe Kristallisationsansätze

Die Kristallisation wurde unter anaeroben Bedingungen im Anaerobenzelt mit Enzymchargen durchgeführt, die unter strikt anaeroben Bedingungen gereinigt worden waren. Zunächst wurde nach geeigneten Kristallisations-Bedingungen gesucht, indem ankonzentrierte (R)-Benzylsuccinat-Synthase mittels „sitting-drop“-Technik oder im Microbatch-Verfahren in vielen verschiedene Puffern auf die Bildung von Kristallen getestet wurde.

Dabei bildeten sich im Microbatch-Verfahren unter Silikonöl in einem Tartrat-haltigen Puffer (0,6 K<sub>2</sub>Na Tartrat, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5) amorphe Kristalle von einer Größe von etwa 50 µm x 50 µm x 50 µm. Diese Kristalle wurden mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht. Keiner der getesteten Kristalle lieferte ein Beugungsmuster. Deshalb wurde nach einer neuen Bedingung für die Kristallisation gesucht. Dieses Mal wurde die „sitting-drop“-Technik eingesetzt und erneut viele verschiedene Puffer getestet. Nachdem sich in einigen Ansätzen

kleine Kristalle gebildet hatten, wurde eine Bedingung ( 100 mM Imidazol pH 8,0, 100 mM Calciumacetat, 10 % PEG 8000 (v/w)) ausgewählt und die Pufferzusammensetzung weiter auf die Züchtung größerer Kristalle hin optimiert. Parameter des Puffers, die verändert wurden waren dabei der pH-Wert, die PEG-Konzentration und Art und Konzentration des eingesetzten Salzes. Die Ergebnisse der Optimierung bei einer Proteinkonzentration von 14 mg/ml sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tab. 6: Optimierung der Pufferbedingungen für die Kristallisierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase.**

Der Übersicht wegen ist hier nur der Trend, den die verschiedenen Substanzen bewirken, angegeben. Die bislang größten Kristalle, die auch am besten streuten, bildeten sich bei 100 mM Imidazol pH 7,9, 12 % PEG, 200 mM MgAcetat und einer Proteinkonzentration von 14 mg ml<sup>-1</sup>.

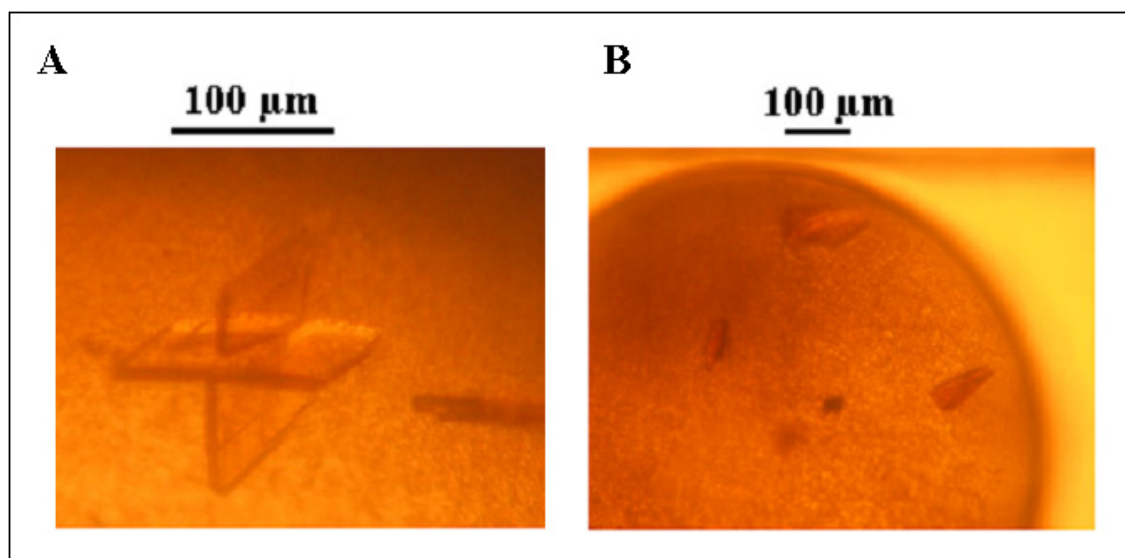
Parameter	Auswirkung auf die Kristallisation
pH-Wert (6,9-8,3)	Optimum: 7,9 Niedrigerer pH: Bildung von Nadeln Höherer pH: Quasipräzipitate/ keine Kristalle
Konzentration von PEG 8000 (w/v)	Optimum: 12 % Niedrigere Konz.: keine Kristalle Höhere Konz.: Proteinpräzipitat
Calciumacetat (200 mM) *	Kleine Kristalle/ Nadeln z. T. entfärbt
Natriumacetat (200 mM) *	Schnelle Kristallbildung (3-4 d); Kristalle mit einer Größe von ca. 50 x 30 x 10 µm )
Rubidiumchlorid (200 mM) *	Keine Kristalle
Calciumchlorid (200 mM) *	Nadeln
Magnesiumacetat (0-500 mM)	Optimum: 200 mM; Kristalle mit einer Größe von ca. 100 x 50 x 20 µm; Niedrigere Konz.: weniger Kristalle Höhere Konz.: Proteinpräzipitat

\* Die verschiedenen Salze wurden unter folgenden Bedingungen getestet: 100 mM Imidazol pH 7,9, 12 % PEG, Proteinkonzentration: 10 –20 mg ml<sup>-1</sup>.

Kristallisierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase wurde bei Proteinkonzentrationen in einem Bereich von 5-30 mg ml<sup>-1</sup> ausgetestet. Bei einer Proteinkonzentration im Bereich von 12 – 18 mg ml<sup>-1</sup> wurden die größten Kristalle gefunden. Bei Proteinkonzentrationen unter

10 mg ml<sup>-1</sup> wurden keine Kristalle gebildet, bei mehr als 25 mg ml<sup>-1</sup> wurde ausschließlich Proteinpräzipitat erhalten.

Unter den optimierten Pufferbedingungen [100 mM Imidazol pH 7,9, 200 mM MgAcetat, 12 % PEG 8000 (w/v)], bildeten sich bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 14 mg ml<sup>-1</sup> nach etwa einer Woche Inkubation Kristalle der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (Abb. 25). Diese Kristalle waren von Form und Größe (etwa 100 x 50 x 20 µm) für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet.



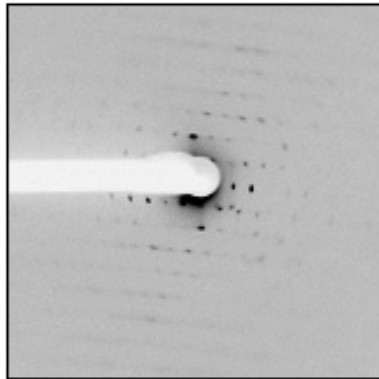
**Abb. 25: Anaerobe Kristallisationsansätze der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase .** Die

Kristallisationsbedingungen mit „sitting-drop“-Technik waren : 100 mM Imidazol pH 7,9, 200 mM MgAcetat, 12 % PEG 8000 (w/v), 14mg ml<sup>-1</sup> (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Proteinlösung und Puffer wurden im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Die Bilder wurden eine Woche nach Anfertigen der Ansätze aufgenommen. **A-** Plattenförmiger Kristall, allerdings zu flach für eine Vermessung. **B** Räumliche Kristalle dieser Art wurden für eine Röntgenstrukturanalyse eingesetzt.

### 2.5.3 Röntgenstrukturanalyse

Die Beugungsmuster der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurden von Daniel Kloer (Institut für Organische Chemie und Biochemie; Freiburg) an der Swiss Light Source (beam line X06SA, Villigen, Schweiz) gemessen. Einige der verfügbaren Kristalle lieferten Beugungsmuster, die bis zu einer Auflösung von etwa 6-8 Å streuten. Aus den Beugungsmustern konnte zwar

eindeutig ersehen werden, dass es sich um Proteinkristalle handelt (Abb. 26), aber die erhaltene Auflösung war noch nicht hoch genug, um eine Strukturbestimmung zu beginnen



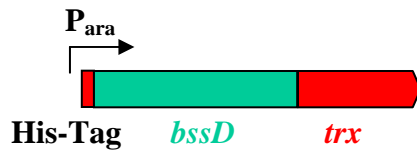
**Abb. 26: Beugungsmuster eines Kristalls der (R)-Benzylsuccinat-Synthase .** Die Vermessung des Kristalls wurde an der Swiss Light Source (beam line X06SA, Villigen, Schweiz) durchgeführt.

## 2.6 Das aktivierende Enzym

### 2.6.1 Klonierung des aktivierenden Enzyms

In vergangen Versuchen, das aktivierende Enzym überzuproduzieren, lag es immer unlöslich in sog. „inclusion bodies“ vor und war damit für weitere Versuche unbrauchbar. Vor kurzem ist es jedoch gelungen, das *bssD*-Gen für das aktivierende Enzym in *E. coli* als lösliches Protein zu exprimieren. Dazu wurde es in einen TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und als Fusionsprotein mit Thioredoxin und His-Tag überproduziert (Joachim Hogg). Dabei steht das *bssD*-Gen unter Kontrolle eines mit L-Arabinose induzierbaren Promotors, mit dem das Maß der Überproduktion abhängig von der Konzentration an L-Arabinose reguliert werden kann. Die Fusion mit Thioredoxin erhöht vermutlich die Löslichkeit des Proteins, und der N-terminale His-Tag ermöglicht eine Aufreinigung des Enzyms mittels Affinitätschromatographie.

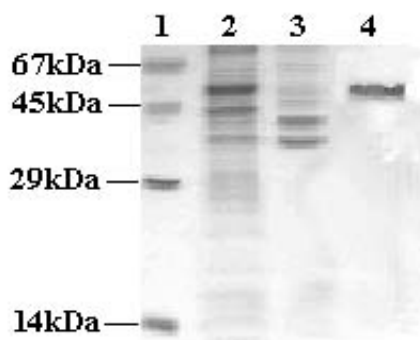
Wird in dieser Arbeit der Begriff „aktivierendes Enzym“ verwendet so ist damit das eben beschriebene rekombinante Enzym gemeint, das neben dem His-Tag noch über eine Fusion mit Thioredoxin verfügt (Abb.27).



**Abb. 27: Genetische Organisation des rekombinanten aktivierenden Enzyms fusioniert mit Thioredoxin und His-Tag.** Das *bssD*-Gen, das für das aktivierende Enzym codiert, steht unter der Kontrolle eines mit L-Arabinose induzierbaren Promotors. N-terminal ist das Enzym mit einem His-Tag, C-terminal mit Thioredoxin fusioniert.

### 2.6.2 Reinigung des aktivierenden Enzyms durch Affinitätschromatographie

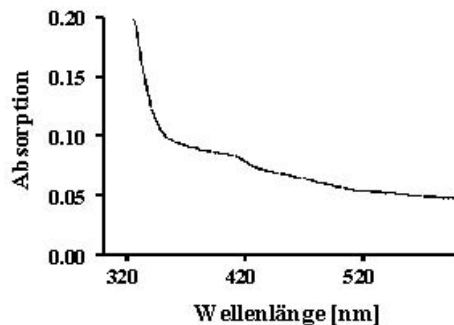
Das aktivierende Enzym wurde unter aeroben Bedingungen gereinigt. Dazu wurde das Enzym als lösliches Fusionsprotein in *E.coli* überproduziert (Abb.28). Das überproduzierte aktivierende Enzym wurde dann in einem Schritt über Affinitätschromatographie (His-Trap-Säule; Amersham Bioscience) gereinigt. Nach Beladen der Säule mit *E. coli*-Zellextrakt wurde ein linearer Imidazol-Gradient von 0 - 500 mM über 30 Säulenvolumina angelegt. Das Enzym eluierte bei etwa 135 mM Imidazol mit etwa 95 %iger Reinheit. Aus 2,5 g Feuchtmasse wurden 2,4 mg gereinigtes aktivierendes Enzym erhalten.



**Abb. 28: Reinigung des aktivierenden Enzyms.** 1- Proteinstandard. 2- *E.coli*-Zellextrakt mit überproduziertem aktivierendem Enzym; Überstand nach 100'000 g Ultrazentrifugation. 3- *E.coli*-Zellextrakt mit überproduziertem aktivierendem Enzym; Pellet nach 100'000 g Ultrazentrifugation 4- Aktivierendes Enzym nach Reinigung durch His-Trap-Säule.

### 2.6.3 UV/Vis-Spektrum

Von gereinigtem aktivierendem Enzym wurde ein UV/Vis-Spektrum in einem Bereich von 300 – 600 nm aufgenommen (Abb. 29). Das Spektrum zeigt ein kleines lokales Maximum bei 410 nm, das auf die Existenz eines oder mehrerer Fe-S-Kofaktoren hinweist, die aufgrund der Sequenz des *bssD*-Genprodukts erwartet werden.



**Abb. 29: UV/Vis-Spektrum von gereinigtem aktivierendem Enzym.** Das Enzym lag in 150 mM Imidazol, 200 mM Kaliumphosphatpuffer, 0,5 M NaCl pH 7,5 vor. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Reader gegen Luft. Keine der in der Enzymlösung vorhandenen Substanzen absorbiert bei 410 nm, so dass die gemessene Absorption bei dieser Wellenlänge durch das Enzym hervorgerufen wurde.

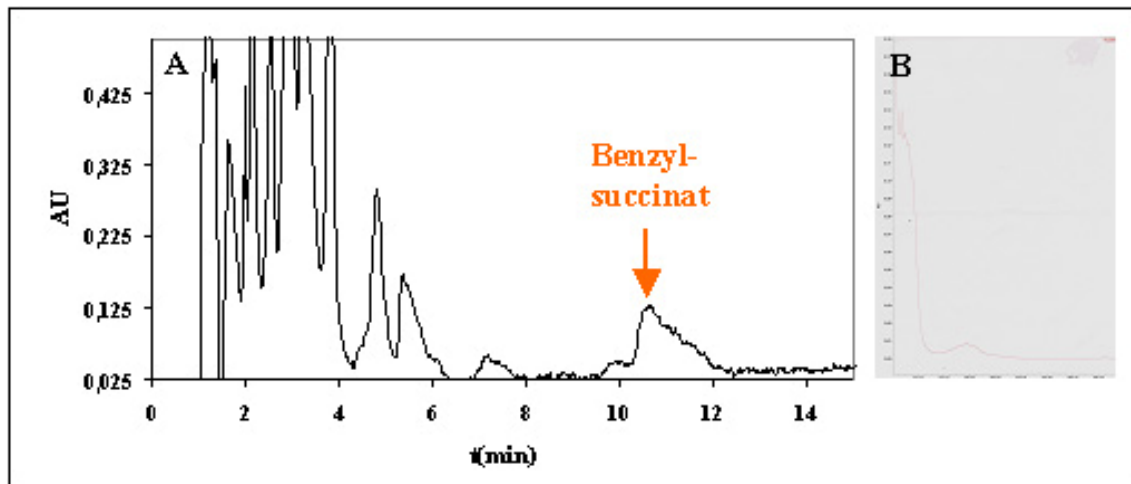
### 2.6.4 Rekonstitution der Fe-S-Cluster

Es wurde eine Rekonstitution der Fe-S-Cluster des aerob gereinigten aktivierenden Enzyms nach einem etablierten Protokoll unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (Knappe *et. al*, 1998). Das rekonstituierte aktivierende Enzym wurde in einen Aktivierungsansatz mit Deazariboflavin als Reduktionsmittel eingesetzt und der Ansatz auf Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat überprüft. Es wurde kein (*R*)-Benzylsuccinat gefunden. Dies kann daran liegen, dass mit Deazariboflavin als Reduktionsmittel keine Aktivierung erfolgt oder das aktivierende Enzym ist wegen der aeroben Reinigung nicht mehr aktivierbar.

## 2.7 Enzymtest zum Nachweis der Aktivierung von (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch das aktivierende Enzym

Wird (*R*)-Benzylsuccinatsynthase nach Überproduktion in *E.coli* auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, so erscheint das Enzym immer als einzelne Bande. Das Enzym liegt damit nach Überproduktion in *E.coli* in nichtaktiviertem Zustand vor. Deshalb muss es für eine Messung der Enzymaktivität durch das aktivierende Enzym in einen radikalischen und damit aktiven Zustand versetzt werden. Das aktivierende Enzym aus *T. aromatica* kann dazu nicht eingesetzt werden, denn es war bislang nicht möglich es in einer aktiven Form aus *T. aromatica* zu reinigen. Deshalb wurden Aktivierungsstudien über die (*R*)-Benzylsuccinatsynthase mit rekombinanten aktivierendem Enzym (siehe 2.7) durchgeführt. Da noch keine anaerobe Reinigungsprozedur für das aktivierende Enzym etabliert ist, wurde in die Aktivierungstests *E.coli*-Rohextrakt mit überproduziertem Enzym eingesetzt.

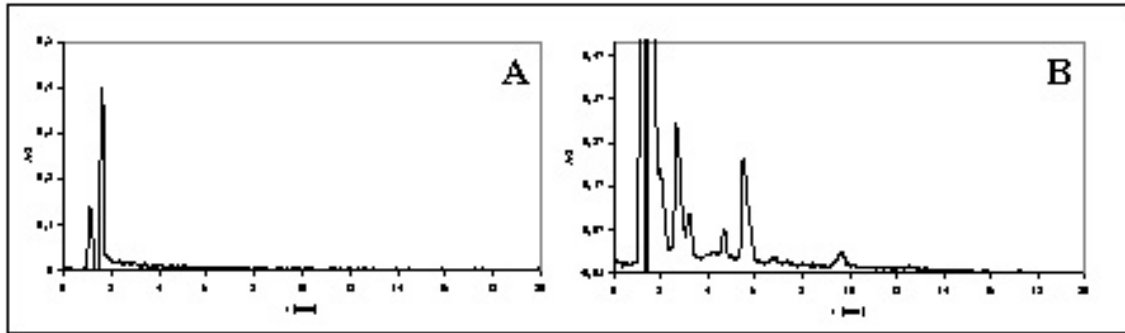
**Aktivierungstest.** Sämtliche Schritte nach der Zellernte wurden unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt durchgeführt, da aktivierte Glycylradikalenzyme wie auch aktivierende Enzyme extrem sauerstoffempfindlich sind. Die Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde in einem diskontinuierlichem Enzymtest bestimmt, wobei die Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat detektiert wurde. Der Nachweis des gebildeten (*R*)-Benzylsuccinats erfolgte über HPLC (Abb. 30 A). In einem Ansatz eines Aktivierungstestes befanden sich gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase und *E.coli*-Rohextrakt mit überproduziertem aktivierendem Enzym, die Substrate *S*-Adenosylmethionin, Toluol und Fumarat und die Reduktionsmittel Dithionit und Titancitrat. Die Reduktionsmittel wurden in den Versuch eingesetzt, um die Fe-S-Cluster des aktivierenden Enzyms zu reduzieren. In der HPLC-Analyse der Aktivierungsansätze eluierte nach etwa 10,5 Minuten eine Substanz, die das typische Spektrum von (*R*)-Benzylsuccinat aufwies mit einem Hauptmaximum bei 218 nm und einem zweiten lokalen Maximum bei 258 nm (Abb. 30 B). Auch die Retentionszeit ist unter den gewählten Bedingungen charakteristisch für (*R*)-Benzylsuccinat.



**Abb. 30: HPLC-Analyse der Aktivierungsversuche von (R)-Benzylsuccinatsynthase. A-HPLC-Chromatogramm des Aktivierungsversuches. B-Spektrum des Produktpeaks.** Der Ansatz enthielt die Substrate Toluol und Fumarat, die die aktivierte (R)-Benzylsuccinat-Synthase zu (R)-Benzylsuccinat umsetzt. Die Aktivierung der (R)-Benzylsuccinat-Synthase erfolgte über das aktivierende Enzym, das in *E.coli*-Zellextrakt vorlag. Zur Reduktion der Fe-S-Cluster des aktivierenden Enzyms wurden die Reduktionsmittel Dithionit und Titancitrat eingesetzt. SAM wirkt als Radikalinitiator. In der Analyse der Aktivierungsversuche wurde durch Koelution in der HPLC-Analyse und Vergleich des Absorptionsspektrums (R)-Benzylsuccinat identifiziert.

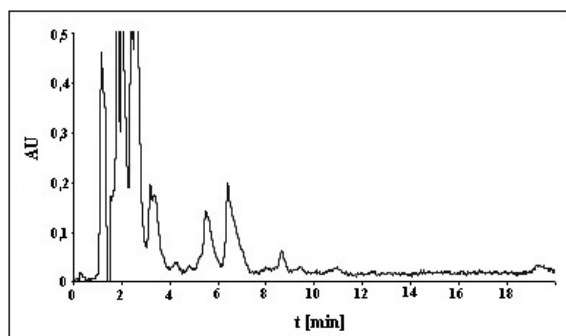
**Kontrollexperimente.** Die Aktivierungsversuche wurden unter identischen Bedingungen in Abwesenheit von gereinigter (R)-Benzylsuccinat-Synthase bzw. aktivierendem Enzym durchgeführt, um die Abhängigkeit der (R)-Benzylsuccinatbildung von beiden Enzymen zu überprüfen. Nach Reaktionsende und Abtrennen der Proteine wurden die Ansätze mittels HPLC auf (R)-Benzylsuccinat untersucht. Weder in dem Ansatz ohne (R)-Benzylsuccinat-Synthase noch in dem ohne aktivierendes Enzym in *E.coli*-Extrakt wurde (R)-Benzylsuccinat in der HPLC-Analyse detektiert (Abb. 31). Damit wurde bestätigt, dass die Produktbildung von beiden Enzymen abhängig ist. Der Hintergrund der im Elutionsprofil in Abbildung 31 B zu sehen ist, stammt vom eingesetzten *E.coli*-Rohextrakt. Er ist in allen aufgetrennten Aktivierungsansätzen in denen *E.coli*-Rohextrakt enthalten ist, zu finden. Dazu gehört auch der Peak, der kurz vor 10 Minuten eluiert (Abb.30 und Abb.31 B). Das Spektrum dieser Substanz stimmt mit dem von (R)-Benzylsuccinat nicht überein.





**Abb. 31: HPLC-Analyse der Kontrollexperimente.** Aktivierungsansätze ohne aktivierendes Enzym bzw. ohne (*R*)-Benzylsuccinatsynthase wurden auf die Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat untersucht. **A** ohne aktivierendes Enzym in *E.coli*-Extrakt. **B** ohne gereinigte (*R*)-Benzylsuccinatsynthase. In den Ansätzen A und B wurde nach der für (*R*)-Benzylsuccinat typischen Retentionszeit von 10,5 min keine Verbindung detektiert. Bei dem Peak bei 10 Minuten in Abb. 31 B handelt es sich nicht um (*R*)-Benzylsuccinat wie aus dem Spektrum der Substanz hervorgeht.

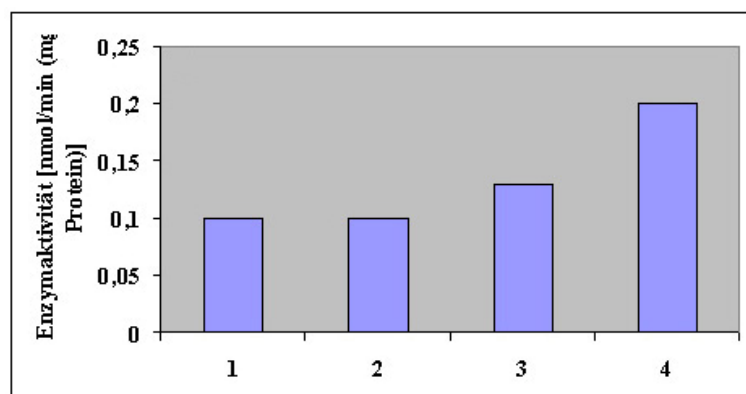
**Inhibition der Aktivierung.** Es wurden Aktivierungsversuche durchgeführt, die zusätzlich 18 mM Mercaptoethanol enthielten. Nach Beenden der Reaktion wurde der Überstand mittels HPLC auf (*R*)-Benzylsuccinat untersucht. Nach der typischen Retentionszeit wurde kein Elutionspeak detektiert (Abb. 32). Mercaptoethanol wirkt damit in dieser Konzentration im Aktivierungstest inhibierend.



**Abb. 32: HPLC-Analyse: Inhibition der Aktivierung durch Mercaptoethanol.** Aktivierungstests, die 18 mM Mercaptoethanol enthielten, wurden nach Reaktionsende und Abtrennen der Proteine via HPLC auf die Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat untersucht. Es wurde in Ansätzen mit Mercaptoethanol kein (*R*)-Benzylsuccinat gefunden.

**Abhängigkeit von Dithionit und Titancitrat.** Es wurde die Abhängigkeit der Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase von verschiedenen Reduktionsmitteln untersucht. Bei Einsatz von Deazariboflavin oder Titancitrat als alleinigem Reduktionsmittel wurde keine Produktbildung festgestellt. Die ersten Aktivierungsversuche, bei denen Aktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase detektiert wurde, enthielten 2 mM Dithionit. Durch zusätzliche Zugabe von Titancitrat zu 2 mM Dithionit wurde die Enzymaktivität noch weiter gesteigert (Abb. 33). Bei einer Konzentration von 2 mM Dithionit und 4 mM Titancitrat wurde die bislang höchste Umsetzung von Toluol und Fumarat zu (*R*)-Benzylsuccinat beobachtet. Dabei wurden Abschätzungen zufolge in einem einstündigen Aktivierungsansatz, der 35 µg gereinigte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase enthielt, 0,4 nmol (*R*)-Benzylsuccinat gebildet. Wenn man davon ausgeht, dass die Produktbildung über die 60 Minuten linear erfolgte, ergeben diese Werte eine minimale Enzymaktivität von 0,2 nmol min<sup>-1</sup> [mg<sup>-1</sup> Protein]. Dieser Wert liegt viel zu niedrig, um damit das Wachstum von *T. aromatica* auf Toluol zu erklären. Es ist also davon auszugehen, dass noch nicht die optimalen Testbedingungen für die Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase *in vitro* gefunden wurden.

Bei Aktivierungsversuchen, in denen bei gleicher Titancitratkonzentration (1 mM) die Konzentration an Dithionit gesteigert wurde (bis 14 mM), wurde immer eine geringere Umsetzung zu (*R*)-Benzylsuccinat beobachtet.



**Abb. 33: Abhängigkeit der Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase von den Reduktionsmitteln Dithionit und Titancitrat.** Es wurden steigende Konzentrationen an Titancitrat in die Aktivierungstests eingesetzt, die 2 mM Dithionit enthielten. Nach Reaktionsende wurden die Ansätze mittels HPLC auf die gebildete Menge an (*R*)-Benzylsuccinat untersucht. **1- 0 mM Titancitrat. 2- 1 mM Titancitrat. 3- 2 mM Titancitrat. 4- 4 mM Titancitrat.** Die höchste Enzymaktivität konnte in dem Ansatz mit 2 mM Dithionit und 4 mM Titancitrat detektiert werden. Die spezifische Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase lag hier Abschätzungen zufolge etwa bei 0,2 nmol min<sup>-1</sup> [mg<sup>-1</sup> Protein].

### 2.1.5 Nachweis der aktivierten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durch Western-Blot

Die aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wird vermutlich wie die native (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach Inkubation an Luft oxygenolytisch gespalten (K. Verfürth, Doktorarbeit). Dabei wird bei der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* am Carboxyterminus der aktivierten  $\alpha$ -Untereinheit ein 4 kDa großes Fragment abgetrennt. Da jeweils nur eine  $\alpha$ -Untereinheit des Holoenzym ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) aktiviert ist, erscheint bei einer Analyse auf SDS-PAGE eine Doppelbande: eine Bande bei 98 kDa ( ungespaltene  $\alpha$ -Untereinheit) sowie eine Bande bei 94 kDa (aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit). Mittels Western-Blot-Analyse gegen den Strep-Tag, der sich am N-Terminus des Enzyms befindet, wurde versucht, aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus den Aktivierungsversuchen (Ergebnisse 2.1.4) zu detektieren. Die Aktivierungsansätze wurden dazu nach Reaktionsende nicht mit Säure gefällt, sondern aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust und für etwa 10 Minuten an Luft inkubiert. Dadurch wird aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase oxygenolytisch gespalten. Nach Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Strep-Tag wurde keine Doppelbande detektiert. Alle Banden liegen auf gleicher Höhe wie unbehandelte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Daraus ist zu schließen, dass die Menge an aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase unterhalb der mit dieser Methode erfassbaren Menge liegt. Diese Annahme ist auch konsistent mit der sehr niedrigen beobachteten Enzymaktivität (Ergebnisse 2.6.4).

## Diskussion

Der anaerobe Abbau von Toluol durch *T. aromatica* beginnt mit der Addition der Methylgruppe von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat. Diese Reaktion katalysiert das Glycylradikalenzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase (Biegert *et al.*, 1996), das durch ein aktivierendes Enzym posttranslational aktiviert wird. Das Produkt (*R*)-Benzylsuccinat wird dann durch  $\beta$ -Oxidation zu Benzoyl-CoA, dem zentralen Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels, oxidiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase und ihr aktivierendes Enzym sowie die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligten Enzyme (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase und (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase untersucht.

### 1. (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase

Es wurde bereits in der ersten Arbeit zum anaeroben Toluol-Stoffwechselweg postuliert, dass das erste Intermediat (*R*)-Benzylsuccinat über einen  $\beta$ -Oxidationsweg weiter zu Benzoyl-CoA umgesetzt wird (Biegert *et al.*, 1996). Benzoyl-CoA ist ein wichtiges Intermediat des anaeroben Aromatenstoffwechsels und sein weiterer Abbauweg ist gut bekannt. Es wurde angenommen, dass (*R*)-Benzylsuccinat zunächst zum CoA-Thioester aktiviert und anschließend oxidiert wird. Die Enzyme, die die ersten beiden Reaktionen der  $\beta$ -Oxidation katalysieren, eine Succinyl-CoA-(*R*)-Benzylsuccinat CoA-Transferase und eine (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase, wurden bereits gereinigt und charakterisiert (Leutwein und Heider, 1999; Leutwein und Heider, 2002). Das Produkt der (*R*)-Benzylsuccinyl-CoA Dehydrogenase wurde als (*E*)-Phenylitaconyl-CoA identifiziert (Leutwein und Heider, 2002). Der nächste Schritt des postulierten  $\beta$ -Oxidationswegs ist nun die Hydratisierung der Doppelbindung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA durch eine spezifische Hydratase. Im Toluol-induzierten *bbs*-Operon wurde tatsächlich ein Gen (*bbsH*) gefunden, dessen Produkt ähnlich zu den Enzymen ist, die bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren analoge Hydratisierungs-Reaktionen katalysieren. Deswegen wurde vermutet, dass *bbsH* für die geforderte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase codiert (Leuthner und Heider, 2000).

Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde heterolog in *E.coli* überproduziert und über zwei Chromatographieschritte gereinigt. Die biochemischen Eigenschaften des Enzyms sind

in Tabelle 7 aufgeführt. Da (*E*)-Phenylitaconyl-CoA bereits bei pH-Werten um den Neutralpunkt hydrolysiert, wurden die Messungen der Enzymaktivität bei einem pH-Wert von 6,2 durchgeführt. Die Hydrolyse von CoA-Thioestern im basischen Milieu ab pH 8,5 ist seit längerem bekannt (Schachter und Taggart, 1953). Ihre Untersuchungen ergaben, dass Benzoyl-CoA bei einem pH-Wert von 8,5 bei 25 °C in 20 Minuten zu 39 % hydrolysiert. (*E*)-Phenylitaconyl-CoA hydrolysiert bereits bei einem pH-Wert von 7. Die besondere Labilität von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA wird vermutlich durch die Doppelbindung verursacht, die in den von Schachter und Taggart untersuchten CoA-Thioestern nicht enthalten ist.

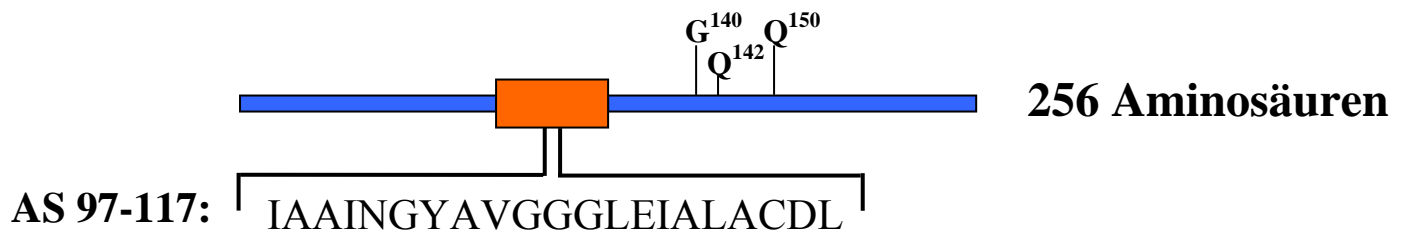
**Tab. 7:** Eigenschaften der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase (Ergebnisse 3.1.1)

<b>Eigenschaft:</b>	
Substrat:	( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA
Produkt:	(Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA
Apparente Molekülmasse:	118 kDa +/- 7 kDa
Zusammensetzung:	$\alpha_4$ (28 kDa)
Kofaktor:	keine
Spez. Aktivität:	52 $\mu\text{mol min}^{-1}$ [mg Protein] <sup>-1</sup>
K <sub>m</sub> -Wert (( <i>E</i> )-Phenylitaconyl-CoA):	104 +/- 34 $\mu\text{M}$

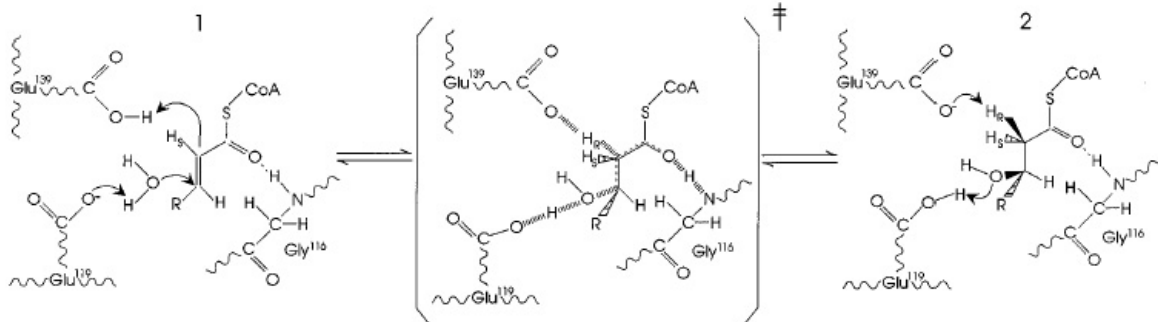
Die gemessene spezifische Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase liegt im erwarteten Bereich. Zum Beispiel hat die Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA Hydratase von *T. aromatica*, die am weiterführenden Benzoyl-CoA-Abbau beteiligt ist, eine spezifische Aktivität von 58  $\mu\text{mol min}^{-1}$  [mg<sup>-1</sup> Protein] (Laempe *et al.*, 1998). Der für die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase für (*E*)-Phenylitaconyl-CoA ermittelte K<sub>m</sub>-Wert liegt mit etwa 100  $\mu\text{M}$  ebenfalls im erwarteten Bereich. Für Wasser, das zweite Substrat der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase, lässt sich kein K<sub>m</sub>-Wert ermitteln, da es im Überschuss vorliegt.

Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gehört zur Familie der Enoyl-CoA Hydratasen, die sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind. Sie enthält neben dem für diese Enzymfamilie charakteristischen Sequenzmotiv (Abb.34) auch die beiden typischen Glutamat-Reste des aktiven Zentrums (He und Yang, 1997). Enoyl-CoA Hydratasen katalysieren die Hydratisierung von 2-trans-Enoyl-CoA- zu 3-Hydroxyacyl-CoA-Thioestern, wobei das Produkt der Reaktion immer in (*S*)-Konformation vorliegt. In *E. coli* und anderen Prokaryoten ist die Enoyl-CoA Hydratase für die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren

Bestandteil eines Fusionsproteins mit anderen beteiligten Enzymen und liegt als Multienzymkomplex vor (Black und DiRusso, 1993). Es wäre deshalb interessant herauszufinden, ob die Enzyme, die (*R*)-Benzylsuccinat zu Benzoyl-CoA oxidieren, sich in ähnlicher Weise zu einem nicht-kovalenten Komplex zusammenlagern. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollen Gel-elektrophoretische Studien unter nativen Bedingungen angestellt werden, die z.B. mit den Antiseren gegen die verschiedenen  $\beta$ -Oxidations-Enzyme Aufschluss über die mögliche Komplexbildung geben können.



**Abb. 34:** Die (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase besitzt ein Sequenzmotiv, das charakteristisch für die Enzymfamilie der Enoyl-CoA Hydratasen ist. Außerdem besitzt das Enzym, die konservierten Glutamatreste und den konservierten Glycinrest, die vermutlich am Reaktionsmechanismus beteiligt sind. Enoyl-CoA Hydratasen sind an der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren beteiligt und katalysieren die Hydratisierung von 2-*trans*-Enoyl-CoA zu 3-Hydroxyacyl-CoA. Die großgeschriebenen Buchstaben repräsentieren die Aminosäuren gemäss des „Ein-Buchstaben-Codes“. Für die Analyse wurde „Prosite“ unter [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch) benutzt.



**Abb. 35: Schema der Hydratisierung durch Enoyl-CoA Hydratasen** (nach He und Yang, 1997). Die Reaktion verläuft vermutlich gemäß einer syn  $\beta$ -Addition-Eliminationsreaktion ab. Verbindung 1 ist das Substrat der Reaktion: 2-*trans*-Enoyl-CoA. Verbindung 2 ist das Produkt der Reaktion: 3-Hydroxyacyl-CoA. In einem ersten Schritt des Mechanismus überträgt ein protoniertes Glutamat des aktiven Zentrums ein Proton auf das  $\alpha$ -C-Atom des Substrats. Gleichzeitig attackiert ein anderes deprotoniertes Glutamat ein Proton eines Wassermoleküls, dessen Sauerstoffatom das  $\beta$ -C-Atom des Substrats nukleophil angreift. Der Übergangszustand, der in eckigen Klammern dargestellt ist, wird durch ein Glycinrest des Polypeptidrückgrats stabilisiert. Im zweiten Schritt des postulierten Mechanismus verlässt das gebildete 3-Hydroxyacyl-CoA das aktive Zentrum. R: Methylgruppe oder ungeradzahlige Alkylgruppe.

Es ist aufgrund der Ähnlichkeit der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase zu anderen Enoyl-CoA Hydratasen anzunehmen, dass die Hydratisierung über den gleichen Reaktionsmechanismus abläuft, den Studien an *E.coli* nahe legen (Abb.35). In einem ersten Schritt könnte demzufolge ein protoniertes Glutamat des aktiven Zentrums der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase ein Proton an das  $\alpha$ -C-Atom von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA übertragen. Gleichzeitig entzieht das andere deprotonierte Glutamat des aktiven Zentrums einem Wassermolekül ein Proton, wobei das entstehende Hydroxylion das  $\beta$ -C-Atom von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA nukleophil angreift. Ein konservierter Glycinrest der Polypeptidkette stabilisiert dabei den Übergangszustand, wodurch die für die Produktbildung nötigen elektronischen Umlagerungen begünstigt werden. Der letzte Schritt der Hydratisierung besteht in der Freisetzung des Produktes. Die Hydratisierung der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase folgt damit einer *syn*  $\beta$ -Additions-/Eliminationsreaktion, wobei die beiden Glutamatreste des aktiven Zentrums durch ihre Funktion als Säure bzw. Base eine große Rolle spielen.

Das Produkt der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase wurde über HPLC nachgewiesen, wobei das Spektrum der Verbindung wie vermutet Charakteristika einer CoA-Thioester Verbindung zeigte. Es wird angenommen, dass es sich dabei um (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA handelt, das zwei chirale C-Atome enthält. Mit den bisherigen Untersuchungen war es nicht möglich, die Stereochemie des Produkts zu bestimmen, da es für weitere chemische Analysen nicht in ausreichender Menge vorlag. Nimmt man allerdings an, dass es sich um eine wie oben (Abb. 35) dargestellte *syn*- $\beta$ -Addition-Eliminationsreaktion handelt, müsste das Produkt in einer (*S*)-(*S*)-Konformation vorliegen. Eventuell kann diese Frage durch massenspektrometrische Untersuchungen mit Fragmentierungsanalysen, bei denen nanomolare Mengen ausreichen, weiter aufgeklärt werden.

## 2. (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase

Der nächste Schritt des  $\beta$ -Oxidationswegs nach der Hydratisierung von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA ist die Oxidation des produzierten (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA zu Benzoylsuccinyl-CoA. Im toluolinduzierbaren *bbs*-Operon sind tatsächlich auch Gene enthalten, die für eine mögliche (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase codieren (*bbsCD*; Leuthner und Heider, 2000). Die Genprodukte dieser beiden Gene sind

zueinander zu 34 % identisch und haben jeweils große Ähnlichkeit zu den Untereinheiten kurzkettiger Alkohol-Dehydrogenasen, zu denen auch die 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenasen der anderen  $\beta$ -Oxidationswege gehören (Leuthner und Heider, 2000). Diese Enzyme liegen normalerweise als Homodimere (bzw. Homotetramere) vor. Bei den *bbsCD*-Genprodukten scheint es sich jedoch abweichend davon um die Untereinheiten eines heterodimeren Enzyms zu handeln. Bemerkenswerterweise ist beim *bssC*-Genprodukt zudem ein hochkonservierter Tyrosinrest des aktiven Zentrums durch einen Valinrest ausgetauscht (Leuthner, 1999). Deshalb ist anzunehmen, dass diese Untereinheit enzymatisch nicht aktiv ist und im Heterodimer eventuell nur strukturelle oder regulatorische Funktionen hat. Die Aktivität der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase ist NAD-abhängig. Diese Hypothese wird unterstützt durch NAD-Bindedomänen, die im N-terminalen Bereich beider Gene gefunden wurden (Leuthner, 1999). Außerdem wird die Oxidation von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA zu Benzoyl-CoA im Rohextrakt von *T. aromatica* durch Zugabe von NAD gesteigert (Leutwein, 2000). Deshalb wurde versucht, über die Reaktion mit NAD einen Test zur Messung der Aktivität des Enzyms zu entwickeln. Da das Substrat der Dehydrogenase [(Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA] kommerziell nicht erhältlich und auch nicht durch einfache chemische Synthese zugänglich ist, wurde die Enzymreaktion an die Reaktion der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gekoppelt. Das Reaktionsprodukt der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase sollte zugleich das Substrat der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase sein, da die Gene der beiden Enzyme im selben Operon liegen.

Es wurde tatsächlich Reduktion von NAD beobachtet, die durch die Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA gestartet werden konnte und von der Anwesenheit der gereinigten *bbsCD*-Genprodukte abhängig war. Allerdings wurden fast gleich hohe Reduktionsraten von NAD auch in Kontrollansätzen ohne zugesetzte (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase gemessen. Diese Inkonsistenz kann eventuell dadurch erklärt werden, dass die gereinigte Dehydrogenase noch Spuren einer unspezifischen Hydratase aus *E.coli* enthält, obwohl das Enzym nach SDS-PAGE rein erschien. Für diese Annahme spricht, dass auch mit den gereinigten Dehydrogenasefraktionen allein nach Zugabe von (*E*)-Phenylitaconyl-CoA eine Absorptionsabnahme bei 295 nm zu beobachten war. Da die spezifische Aktivität von Enoyl-CoA Hydratasen generell sehr hoch ist, würden minimale Verunreinigungen ausreichen. Um solch eine Kontamination auszuschließen, sind weitere chromatographische Reinigungsschritte der (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA Dehydrogenase nötig.



Der gekoppelte Enzymtest wurde via HPLC auf die Entstehung eines Produktes untersucht. Es wurde dabei allerdings kein Benzoylsuccinyl-CoA gefunden, sondern nur (Hydroxymethylphenyl)succinyl-CoA. Aufgrund der Resultate der NAD-Reduktion waren auch nur sehr geringe Mengen Produkt zu erwarten, die vermutlich unter der Nachweisgrenze des HPLC-Detektors lagen. Nach Abschluss meiner Untersuchungen wurde in weiteren Versuchen bereits das letzte Enzym des postulierten  $\beta$ -Oxidationswegs von (*R*)-Benzylsuccinat zum Reaktionsansatz zugegeben, eine  $\beta$ -Ketothiolase, die Benzoylsuccinyl-CoA weiter zu Benzoyl-CoA und Succinyl-CoA umsetzen sollte. In diesen Versuchen konnten geringe Konzentrationen von Benzoyl-CoA als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden (M. Lippert, pers. Mitteilung). Daraus lässt sich schließen, dass die Dehydrogenase tatsächlich die geforderte Reaktion katalysiert.

### **3. (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase**

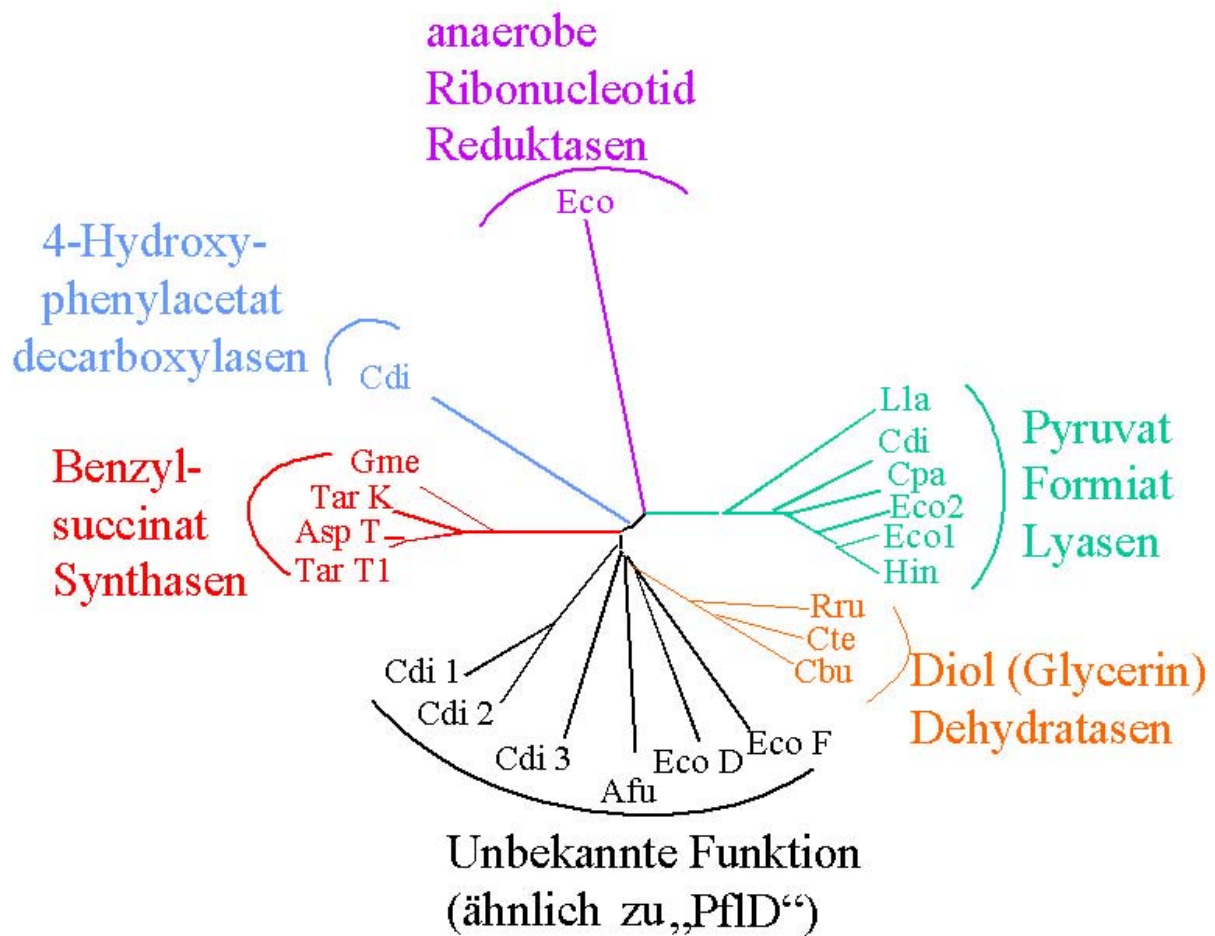
Die initiale Reaktion des anaeroben Toluolabbaus ist die Addition von Toluol an die Doppelbindung von Fumarat unter Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat. Diese Reaktion wird von dem Enzym (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase katalysiert (Biegert und Heider, 1996), das zur Familie der Glycylradikalenzyme gehört. Um das Enzym nach seiner Synthese in einen aktiven Zustand zu überführen, ist ein weiteres sog. aktivierendes Enzym nötig, das posttranslational das Radikal in die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase einführt. In dieser Arbeit wurden biochemische und spektroskopische Studien an beiden Enzymen durchgeführt.

#### **3.1 Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase als Glycylradikalenzym**

Die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase gehört zur Familie der Glycylradikalenzyme, die als Charakteristikum ein Glycylradikal in der Polypeptidkette tragen, wenn sie im aktivierten Zustand vorliegen. Das Radikal ist Teil des aktiven Zentrums und damit direkt an der enzymatischen Katalyse beteiligt. Wird das Glycylradikal zum Beispiel durch Exposition an Sauerstoff zerstört, ist das Enzym damit irreversibel inaktiviert (Wagner *et al.*, 1992). Die Familie der Glycylradikalenzyme wächst stetig und lässt sich momentan aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften in acht Gruppen einteilen (Selmer *et al.*, 2005), von denen fünf

Vertreter bekannte Funktionen haben. Diese fünf Gruppen sind (i) die Pyruvat-Formiat-Lyasen (Knappe *et al.*, 1984), (ii) die anaeroben Ribonukleotid-Reduktasen (Sawers und Watson, 1998), (iii) die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen (Leuthner *et al.*, 1998), (iv) die *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase und verwandte Enzyme (Selmer und Andrei, 2001) und die (v) CoenzymB12-unabhängigen Glycerin-Dehydratasen (Raynaud *et al.*, 2003) (Abb. 36). Mit Ausnahme der *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase und den (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen bestehen alle bekannten Glycylradikalenzyme nur aus einer Polypeptidkette, die bei allen Vertretern der Familie konserviert ist. Zusätzlich zu dieser konservierten Glycylradikal-haltigen Untereinheit enthält die *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase eine weitere kleine Untereinheit, während die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen als einzige Gruppe sogar zwei kleine zusätzliche Untereinheiten besitzen. In beiden kleinen Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen sind darüber hinaus konservierte Cysteine enthalten (z. B. jeweils ein „CX<sub>2</sub>C“-Motiv) (Leuthner, 1999), die möglicherweise an der Bindung von Fe-S-Zentren beteiligt sind.

Die relative enge Verwandtschaft der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* zur Glycerin-Dehydratase aus *Clostridium butyricum* könnte für die angestrebte Aufklärung der Kristallstruktur bedeutsam werden, da von letzteren bereits die Struktur gelöst wurde (O'Brien *et al.*, 2004). Die Ähnlichkeit sollte bei der Strukturaufklärung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zur Lösung des Phasenproblems ausreichen, indem durch „molekularen Austausch“ Strukturmodelle erstellt werden. Zusätzlich kann dafür auch die anomale Röntgenstreuung (MAD-Phasing für „multiwavelength anomalous diffraction“) der im Enzym enthaltenen Eisenatome ausgenutzt werden. Die Röntgen-Beugungsmuster der bisher gemessenen Kristalle der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase deuten aufgrund von Unschärfen der erhaltenen Signale auf Kristallfehler hin. Da einige Beobachtungen während dieser Arbeit darauf hinweisen, dass bereits kurze Exposition an Luft dem Enzym schadet, sollen die Kristalle für die weiteren Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen gepickt und auf die Träger montiert werden, um so unter schonenderen Bedingungen eventuell an intakte Kristalle zu kommen. Die entsprechende Ausrüstung und das Know-how werden in Kürze zur Verfügung stehen. Ein weiterer Ansatz, um die Struktur des Enzyms zu lösen, der bereits verfolgt wird, besteht in der Kristallisation einer (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus einem zu *T. aromatica* eng verwandten Organismus. Dazu wird die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase aus *Geobacter metallireducens* als Strep-Tag-Fusionsprotein kloniert, um eine leichte Aufreinigung zu ermöglichen. Das Projekt wird zur Zeit noch bearbeitet.



**Abb. 36: Verwandtschaftsvergleich der Glycylradikalenenzyme.** Alle Mitglieder besitzen in aktivierter Form in ihrem aktiven Zentrum ein Glycylradikal, das essentiell ist für die Aktivität des Enzyms. Alle Enzyme mit Ausnahme der Gruppe der 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylasen und der Benzylsuccinat-Synthasen bestehen aus nur einer Untereinheit. Die 4-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase besitzt eine weitere kleine Untereinheit, die Benzylsuccinat-Synthasen zwei kleine Untereinheiten.

Eco: *E.coli*; Lla: *Lactococcus lactis*; Cdi: *Clostridium difficile*; Cpa: *Clostridium pasteurianum*; Hin: *Haemophilus influenzae*; Afu: *Archaeoglobus fulgidus*; Tar: *T. aromatica*; Asp: *Azoarcus sp.*

### 3.2 Strukturelle Eigenschaften der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Das UV/Vis-Spektrum gereinigter, rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase liefert durch die Absorption bei 410 nm Hinweise auf einen im Enzym enthaltenen Kofaktor (Ergebnisse 2.3). Zusätzlich hatte eine Elementaranalyse gereinigter rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase sechs Eisenatome pro Holoenzym ergeben, wobei bei dieser Analyse keine weiteren Metalle gefunden wurden. Deshalb war anzunehmen, dass es sich bei dem Kofaktor um Fe-S-Zentren handelt. Um diese genauer zu charakterisieren und ihre Anzahl zu bestimmen, wurden ESR-Analysen mit gereinigter, nicht aktivierter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase durchgeführt. Bei tiefen Temperaturen ( $< 30$  K) wurde ein Signal beobachtet, das bei Temperaturen über 40 K verschwand. Das Signal wurde nur im oxidierten Enzym beobachtet, während nach Reduktion mit Dithionit kein ESR-Signal mehr zu sehen war. Diese Eigenschaften sind charakteristisch für  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster, die in reduziertem Zustand „ESR-still“ sind und im oxidierten Zustand aufgrund ihrer Relaxationseigenschaften nur bei tiefen Temperaturen zu beobachten sind. Mit „power saturation“-Studien wurde gezeigt, dass es sich um zwei verschiedene  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster handelt, die bei ansteigender Mikrowellenleistung unterschiedliche Sättigungseigenschaften zeigten.

Die rekombinante, nicht aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase enthält also zwei  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster pro  $(\alpha_2\beta_2\gamma_2)$ -Holoenzym. Es ist bisher unklar, weshalb sich die beiden Fe-S-Cluster in der ESR-Spektroskopie unterschiedlich verhalten. Offensichtlich unterscheiden sie sich in ihrer Proteinumgebung, was eventuell auf einen unsymmetrischen Aufbau des Enzyms hindeutet. Es sind Mössbauerstudien von mit  $^{57}\text{Fe}$  markiertem gereinigtem Enzym geplant, die weiteren Aufschluss über die Natur der Fe-S-Zentren und ihre Anordnung im Enzym geben könnten.

### 3.3 Inhibition der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

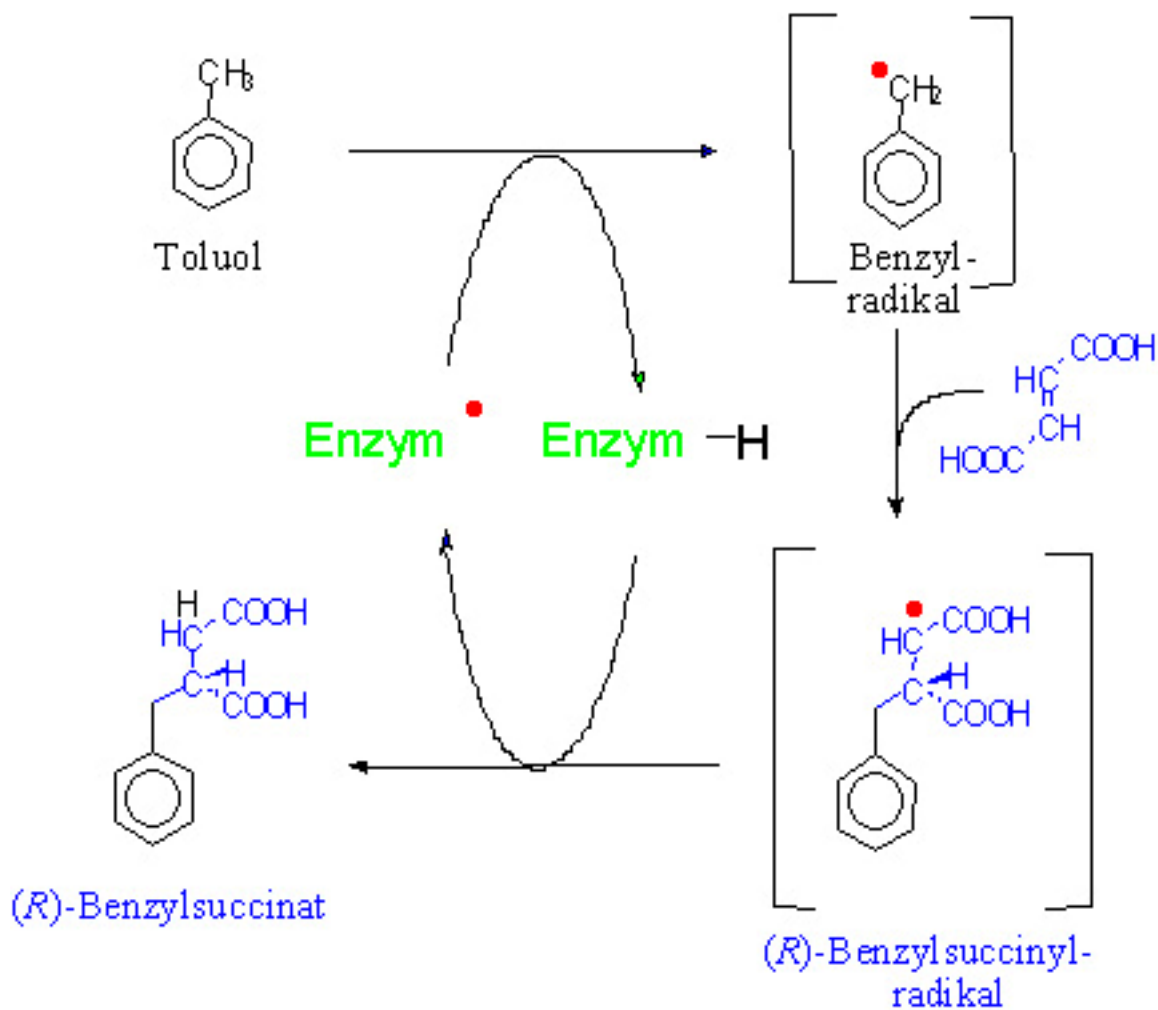
Die native (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wird wie erwartet durch Behandlung mit  $\text{O}_2$  inaktiviert, aber überraschenderweise auch durch Inkubation mit NO, CO und Cyanid inhibiert, die bisher nicht als Inhibitoren für Glycylradikalenzyme bekannt waren (Verfürth, 2004). Durch ESR-Analysen wurde gezeigt, dass  $\text{O}_2$  das Glycylradikal des aktivierten Enzyms zerstört, die anderen Inhibitoren dieses Radikal allerdings nur wenig oder gar nicht beeinflussen (Verfürth, 2004). Es wurde deshalb vermutet, dass NO, CO und Cyanid die

Funktion des Enzyms durch Interaktion mit den Fe-S-Zentren beeinträchtigen. Um die Wirkung dieser Inhibitoren auf die Fe-S-Cluster des Enzyms genauer zu untersuchen, wurde gereinigte, nicht aktivierte (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit den Inhibitoren versetzt und dann mittels ESR-Spektroskopie analysiert. Nach Inkubation der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit Cyanid kam es nicht nur zu einer Verringerung des gesamten ESR-Signals, sondern es wurden auch die Resonanzeigenschaften bei bestimmten *g*-Werten verändert. Das kann durch eine mögliche Interaktion von Cyanid mit den Fe-S-Clustern der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase erklärt werden, durch die somit vermutlich die Enzymaktivität herabgesetzt wird. Cyanid könnte z. B. durch Veränderung des Redoxzustandes der Fe-S-Cluster eine für die Enzymaktivität essentielle Weiterleitung von Elektronen beeinträchtigen. Nach Inkubation der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit CO wurde ein neues radikalähnliches Signal entdeckt. Die Entstehung einer organischen Radikalspezies kann ebenfalls durch eine Interaktion der  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren des Enzyms mit CO erklärt werden, bei der aus CO ein Formylradikal entstehen könnte. Die  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster des Enzyms wären auch in diesem Fall durch den Inhibitor beeinflusst, was die Ursache für die Inhibition der Enzymaktivität sein könnte. Weitere detailliertere Studien zur Interaktion der Fe-S-Zentren der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase mit CO und Cyanid mittels FTIR (Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie) sind geplant.

Die Inkubation des nicht aktivierten Enzyms mit NO bewirkt eine starke Veränderung des gesamten ESR-Signal. NO bindet deshalb vermutlich ebenfalls in der Nähe oder direkt an die  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren. Messungen von mit NO inkubiertem Enzym bei verschiedenen Temperaturen ergaben, dass sich verschiedene Resonanzen unterschiedlich verhalten, was auf die Existenz von zwei verschiedenen  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren hindeutet, die beide durch NO beeinträchtigt sind. Außerdem sind die ESR-Signale des NO-behandelten Enzyms auch noch bei hohen Temperaturen zu beobachten (bis  $>57\text{ K}$ ), was ebenfalls auf eine direkte Interaktion der Fe-S-Zentren mit dem NO-Radikal hinweist. Diese Beobachtung unterstützt auch die Ergebnisse der „power saturation“-Studien, wonach die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zwei verschiedene  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Zentren enthält.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann man folgern, dass die Fe-S-Zentren der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase neben dem Glycylradikal am enzymatischen Mechanismus beteiligt sein müssen. Als Reaktionsmechanismus des Enzyms wurde bislang eine Sequenz postuliert wie in Abbildung 37 und Abbildung 38 A gezeigt. Es wurde angenommen, dass die Reaktion über einen Ternärkomplex-Mechanismus verläuft, bei dem beide Substrate simultan im aktiven Zentrum binden und zu einem Produkt reagieren (bi-uni-Mechanismus). Als erster

Schritt würde dabei die aktivierte radikalische (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase homolytisch ein Wasserstoffatom der Methylgruppe des Toluols abspalten. Das entstandene Benzylradikal könnte dann unter Bildung eines Benzylsuccinyl-Radikals an die Doppelbindung des Fumarats addieren. Dieses Produkt-Radikal würde schließlich unter Bildung von (*R*)-Benzylsuccinat das Wasserstoffatom aus dem aktiven Zentrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase re-abstrahieren, das Enzym dadurch wieder in seinen radikalischen Ausgangszustand versetzen und für einen neuen Reaktionszyklus reaktivieren.



**Abb. 37: Modell des Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase.** Das radikalische Reaktionszentrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase abstrahiert ein Wasserstoffatom der Methylgruppe des Toluols. Das dabei entstandene Benzylradikal addiert an die Doppelbindung des Fumarats unter Ausbildung eines (*R*)-Benzylsuccinylradikals. Das (*R*)-Benzylsuccinylradikal re-abstrahiert das Wasserstoffatom aus dem aktiven Zentrum der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase. Dadurch entsteht zum einen das Produkt der Reaktion (*R*)-Benzylsuccinat. Zum anderen wird die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wieder in ihren radikalischen Ausgangszustand versetzt und ist für einen neuen Reaktionszyklus bereit.

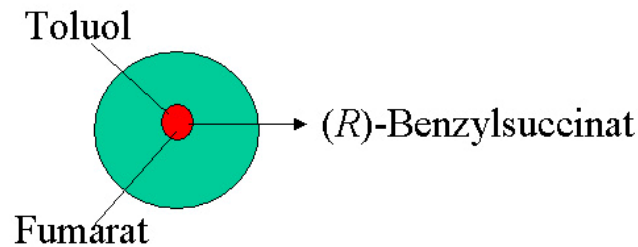
Bei diesem postulierten Mechanismus sind die inzwischen durch mehrere Analysen (Ergebnisse 2.3 und 2.4) bestätigten Fe-S-Zentren der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nicht beteiligt. Aufgrund der ESR-Studien und der Inhibitorstudien (Ergebnisse 2.4.4) ist aber anzunehmen, dass die Fe-S-Zentren doch eine Rolle im Mechanismus des Enzyms spielen. Außerdem haben neue kinetische Untersuchungen gezeigt, dass der Reaktionsmechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase vermutlich nicht über einen Ternärkomplex abläuft, sondern einem ping-pong-Schema folgt (Verfürth, 2005). Deshalb wurde ein neuer Reaktionsmechanismus für die (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase vorgeschlagen, der sowohl die im Enzym enthaltenen Fe-S-Zentren berücksichtigt als auch mit einem ping-pong-Mechanismus konsistent ist (Abb. 38 B). Nach diesem Schema würde weiterhin zuerst Toluol im radikalischen, aktiven Zentrum der aktivierten (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zu einem Benzylradikal aktiviert. Das entstandene Benzylradikal verlässt anschließend das aktive Zentrum, indem es vom Glycylradikal-Zentrum der großen Untereinheit zu einem der Fe-S-Zentren wandert, die vermutlich von den kleinen Untereinheiten koordiniert werden. Dort würde das Benzylradikal dann an die Doppelbindung eines an die Fe-S-Zentren gebundenen Fumarats addieren. Das entstandene (*R*)-Benzylsuccinylradikal müsste schließlich zurück zum Glycin-Zentrum, wo es das Wasserstoffatom unter Produktbildung re-abstrahiert und den ursprünglichen aktiven Zustand der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wieder herstellt.

Dem ping-pong-Mechanismus wird durch diesen modifizierten Mechanismus insofern Rechnung getragen, als dass das Benzylradikal als erstes Produkt das aktive Zentrum verlässt, ohne jedoch vom Enzym freigesetzt zu werden. Die radikalische Addition an das Fumarat-Cosubstrat würde an einem der Fe-S-Zentren als „zweitem aktiven Zentrum“ der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase ablaufen. Das zweite Substrat, das im aktiven Zentrum umgesetzt wird, wäre diesem Schema zufolge das (*R*)-Benzylsuccinylradikal, das an einem der Fe-S-Zentren gebildet wurde. Das vom ping-pong-Mechanismus geforderte zweite Produkt wäre dann (*R*)-Benzylsuccinat.

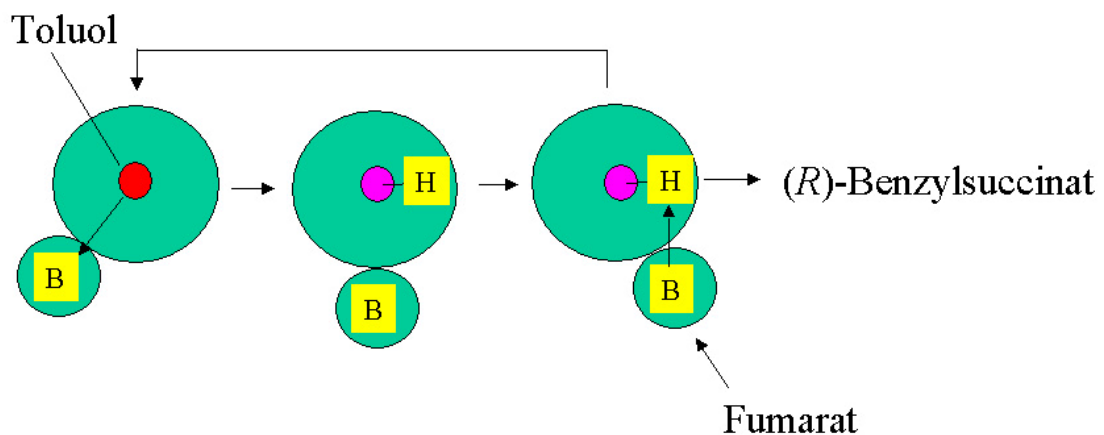
Die Fe-S-Zentren, die in den kleinen Untereinheiten der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase vermutet werden, sind gute Kandidaten für das postulierte „zweite aktive Zentrum“. Sie könnten zum Beispiel Fumarat binden, und damit das Cosubstrat für weitere Reaktionen mit dem Benzylradikal bereithalten. Dass Fe-S-Zentren eines Enzyms nicht nur an Redoxprozessen beteiligt sind, sondern auch andere Funktionen innehaben können ist seit längerem bekannt. Berühmtes Beispiel ist die Aconitase, die mit ihrem [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Zentrum Citrat bindet und die stereospezifische Umformung in Isocitrat katalysiert (Lippard und Berg,

1994). Auch die Fe-S-Zentren der Endonuklease III sind nicht an Redoxprozessen beteiligt, sondern bei der DNA-Bindung (Beinert und Kiley, 1999).

### A Mechanismus über einen Ternärkomplex:



### B Modifizierter ping-pong-Mechanismus:



**Abb. 38: Hypothetische Reaktionsmechanismen der (R)-Benzylsuccinat-Synthase. A Ausbildung eines Ternärkomplexes.** Toluol und das Cosubstrat Fumarat binden simultan im aktiven Zentrum der (R)-Benzylsuccinat-Synthase. Das dort gebildete (R)-Benzylsuccinat wird dann vom Enzym freigesetzt. Für eine detailliertere Beschreibung siehe Abb. 37. **B Modifizierter ping-pong-Mechanismus.** Toluol wird indem ein Wasserstoffatom durch das radikalische, aktive Zentrum des Enzyms abstrahiert wird, zu einem Benzylradikal aktiviert, das mit einem in den kleinen Untereinheiten lokalisierten Fumarat zu einem (R)-Benzylsuccinylradikal reagiert. Dieses Produktradikal re-abstrahiert das Wasserstoffatom aus dem aktiven Zentrum, wobei (R)-Benzylsuccinat entsteht und der radikalische Ausgangszustand der (R)-Benzylsuccinat-Synthase wiederhergestellt ist.

Neueste Studien zum Mechanismus der (R)-Benzylsuccinat-Synthase weisen darauf hin, dass Toluol in *syn* an Fumarat addiert (Qiao und Marsh, 2005). Bei dieser Arbeit wurde allerdings davon ausgegangen, dass die Reaktion über einen Ternärkomplex abläuft. Die *syn*-Addition



widerspricht aber auch nicht dem Modell des modifizierten ping-pong-Mechanismus, so dass weitere Studien durchgeführt werden müssen, um die Frage nach dem Mechanismus der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zu klären.

#### 4. Aktivierendes Enzym

Das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase wurde heterolog in *E.coli* als Fusionsprotein mit His-Tag und Thioredoxin überproduziert. Damit ist es zum ersten Mal gelungen, das Enzym in löslicher Form rekombinant in einer aktiven Form zu produzieren. Der His-Tag eröffnete darüber hinaus die Möglichkeit einer einfachen Reinigung, die bislang allerdings nur in kleinem Maßstab durchgeführt wurde. Nach Etablieren der Reinigungsprozedur im größeren Maßstab sollte es möglich sein, gereinigtes aktivierendes Enzym in ausreichenden Mengen zu produzieren, um damit weitere spektroskopische und biochemische Studien durchzuführen zu. Von großem Interesse sind dabei vor allem ESR-Studien, um die vermuteten Fe-S-Zentren des Enzyms zu analysieren. Alle aktivierenden Enzyme besitzen einen hochkonservierten Bereich, in dem drei Cysteine liegen, die ein  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum koordinieren (Sofia *et al.*, 2001). Zusätzlich zu dieser hochkonservierten Sequenz wurden im aktivierenden Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase noch Sequenzmotive für Ferredoxin-ähnliche Domänen gefunden, die sonst nur noch im aktivierenden Enzym der *p*-Hydroxyphenylacetat-Decarboxylase enthalten sind. Das  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum des aktivierenden Enzyms der Pyruvat-Formiat-Lyase wurde bereits intensiv mit spektroskopischen Methoden analysiert. Dabei wurden neben dem erwähnten  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrum kuboidale und lineare  $[\text{Fe}_3/\text{S}_4]^+$  und  $[\text{Fe}_2/\text{S}_2]$ -Zentren gefunden, allerdings immer in inaktiven Enzymfraktionen (Krebs *et al.*, 2002). Man nimmt deshalb an, dass es sich bei diesen Formen des Fe-S-Zentrums um Zerfallsprodukte des  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters handelt. Die Labilität des  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Zentrums würde auch die hohe Instabilität des Enzyms erklären. Da das aktivierende Enzym der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase vermutlich zusätzlich noch weitere Fe-S-Zentren enthält, ist anzunehmen, dass das Enzym noch instabiler als die bisher charakterisierten aktivierenden Enzyme ist.

## 5. Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase

Bisher war es nur möglich, die Enzymaktivität der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase im Rohextrakt von *T. aromatica* zu bestimmen. Sämtliche Reinigungsversuche der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase und des aktivierenden Enzyms führten immer zu einem drastischen Verlust der Enzymaktivität. Hiermit ist es erstmals gelungen, die Enzymaktivität gereinigter, rekombinanter (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase nach in-vitro-Aktivierung nachzuweisen. Dazu wurde gereinigtes Enzym mit rekombinantem aktivierendem Enzym in *E.coli*-Rohextrakt und den Substraten Toluol, Fumarat, *S*-Adenosylmethionin sowie den Reduktionsmitteln Dithionit und Titancitrat versetzt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde (*R*)-Benzylsuccinat mittels HPLC detektiert, was auf eine erfolgreiche Aktivierung der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase schließen lässt.

Aufgrund der Menge des gebildeten (*R*)-Benzylsuccinats beträgt die spezifische Enzymaktivität des aktivierten Enzyms mindestens  $0,2 \text{ nmol min}^{-1} [\text{mg}^{-1} \text{ Protein}]$ . Dieser Wert liegt deutlich niedriger als erwartet, ist aber etwa ähnlich hoch wie die Aktivität, die bei den anfänglichen Experimenten zum aktiven Enzym in Rohextrakten von *T. aromatica* gemessen wurde (Biegert *et al.*, 1996). Der Aktivierungstest kann vermutlich noch weiter optimiert werden, so dass noch höhere Aktivitäten erreicht werden. Die sehr niedrige Enzymaktivität legt nahe, dass ein weiterer Faktor benötigt wird. Dabei könnte es sich um das Genprodukt von *BSSE* handeln, das große Ähnlichkeit zu bekannten ATP-abhängigen Effektor-Proteinen besitzt, die Funktionen in der Aktivierung und Assemblierung von anderen Proteinen haben (Neuwald *et al.*, 1999). Das Gen *BSSE* befindet sich im *BSS*-Operon und dort in unmittelbarer Nachbarschaft von *BSSB*, das für die  $\beta$ -Untereinheit der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase codiert (Hermuth *et al.*, 2002). Eine mögliche Aufgabe des Genprodukts von *BSSE* könnte darin bestehen, die Fe-S-Zentren des aktivierenden Enzyms in einen aktiven Zustand zu überführen. Denkbar ist ebenfalls, dass das Effektor-Protein benötigt wird, um die Interaktion zwischen aktivierendem Enzym und (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase zu optimieren. Weitere Aktivierungsversuche der (*R*)-Benzylsuccinat-Synthase in denen zusätzlich das Genprodukt von *BSSE* enthalten ist, werden Aufschluss darüber geben.

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Bss	Benzylsuccinat-Synthase
Bbs	$\beta$ -Oxidation von Benzylsuccinat
CoA	Coenzym A
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
ESR	Elektronenspinresonanz
FPLC	fast performance liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung
$\lambda$	Wellenlänge
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Konstante
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OD	optische Dichte
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis	ultra violet/visible
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Ladung

**Amann E., Ochs B., Abel K. (1988).** Tightly regulated tac promotor vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301-315.

**Anders H., Kaetzke A., Kampfer P., Ludwig W., Fuchs G. (1995).** Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K172 und KB740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. Nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. Nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Sys. Bact.* **45**:327-333.

**Andrei P., Pierik A., Zauner S., Andrei-Selmer L., Selmer T. (2004).** Subunit composition of the glycyl radical enzyme *p*-hydroxyphenylacetate decarboxylase. *Eur. J. Biochem.* 1-6 (2004).

**Andersson J., Westman M., Sahlin M., Sjöberg B. (2000).** Cysteines involved in radical generation and catalysis of class III anaerobic ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **275**:19449-19455.

**Begg Y., Wyte J., Haddock B. (1977).** The identification of mutants of *Escherichia coli* deficient in formate dehydrogenase and nitrate reductase activities using dye indicator plates. *FEMS Microbiol. Lett.* **2**:47-50.

**Beinert H., Kiley P. (1999).** Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**:152-157.

**Beller H., Edwards E. (2000).** Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in highly enriched methanogenic culture. *Appl. Env. Microbiol.* **66**:5503-5505.

**Beller H., Spormann A., Sharma P., Cole J., Reinhard M. (1996).** Isolation and Characterization of a Novel Toluene-Degrading, Sulfate-Reducing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:1188-1196.

**Beller H., Reinhard M., Grbic-Galic D. (1992).** Metabolic By-Products of Anaerobic Toluene Degradation by Sulfate-Reducing Enrichment Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:3192-3195.

---

**Bertini, Gray, Lippard, Valentine (1994).** Bioinorganic Chemistry. *University Science Books*.

**Biegert T., Fuchs G., Heider J. (1996).** Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**:661-668.

**Black P., DiRusso C. (1993).** Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *E.coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1210**:123-145.

**Boll M., Fuchs G., Heider J. (2002).** Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**:604-11

**Boll M., Fuchs G. (1995).** Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem.* **234**:921-33.

**Bradford M. (1970).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.

**Burland S. (1999).** Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Env. Microbiol.* **65**:529-533.

**Caro Y., Masaguer C., Ravina E. (2003).** Preparation of (R)-(-)- and (S)-(+)-3-hydroxymethyl-1-tetralone tosylate, key intermediates in the synthesis of new CNS drugs, via resolution of precursors. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**: 381-387.

**Conradt H., Hohmann-Berger M., Hohmann H., Blaschkowski H., Knappe J. (1984).** Pyruvate-formate-lyase (inactive form) and pyruvate formate-lyase activating enzyme of *Escherichia coli*: isolation and structural properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **228**:133-142.

**Dagley S. (1984).** Microbial degradation of aromatic compounds. *Dev. Ind. Microbiol.* **25**:53-56.

---

**Dawson R., Elliot D., Elliot W., Kenneth M. (1986).** Data for biochemical research, 3<sup>rd</sup> ed., Clarendon Press, Oxford: 124-125.

**Dolfing J., Zeyer J., Binder-Eicher P., Schwarzenbach R. (1990).** Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**:336-341.

**Evans P., Ling W., Goldschmidt B., Ritter E., Young L. (1992).** Metabolites Formed during Anaerobic Transformation of Toluene and *o*-Xylene and Their Proposed Relationship to the Initial Steps of Toluene Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* **58**:496-501.

**Finette B., Subramanian V., Gibson D. (1984).** Isolation and Characterization of *Pseudomonas putida* PpF1 Mutants Defective in the Toluene Dioxygenase Enzyme System. *Journal of Bacteriology* **160**:1003-1009.

**Fischer-Romero C., Tindall B.J., Jüttner F. (1996).** *Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a Toluene-Producing Bacterium from Anoxic Sediments of a Freshwater Lake. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:183-188.

**Frazer A., Ling W., Young L. (1993).** Substrate Induction and Metabolite Accumulation during Anaerobic Toluene Utilization by the Denitrifying Strain T1. *Applied and Environmental Microbiology* **59**:3157-3160.

**Gibson D., Subramanian V. (1984).** Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *Gibson D. ed.: Microbial degradation of organic compounds.*

**Grbic-Galic D., Vogel T. (1987).** Transformation of Toluene and Benzene by Mixed Methanogenic Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:254-260.

**Gottschalk G. (1998).** Bacterial metabolism. 2ed. Springer Verlag Berlin.

**Haarwood C., Parales R. (1996).** The  $\beta$ -ketoadipate pathway and the biology of self identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:553-590.

**Heider J. (2001).** A new family of CoA-transferases. *FEBS Letters* **509**:345-349.

**Heider J., Spormann A., Beller H., Widdel F. (1999).** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* **22**:459-473.

**Hermuth K., Leuthner B., Heider J. (2002).** Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain 172. *Arch. Microbiol.* **177**:132-138.

**Hermuth K. (2002).** Untersuchungen zum anaeroben Abbau von Kohlenwasserstoffen in denitrifizierenden Bakterien. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br..

**Höffken H., Duong M., Friedrich T., Breuer M., Hauer B., Reinhardt R., Rabus R., Heider J. (2006).** Crystal Structure and Enzyme Kinetics of the (S)-Specific 1-Phenylethanol Dehydrogenase of the Denitrifying Baczerium Strain EbN1. *Biochemistry* **45**: 82-93.

**Hofstein H., Feng Y., Anderson V., Tonge P. (1999).** Role of Glutamate 144 and Glutamate 164 in the Catalytic Mechanism of Enoyl-CoA Hydratase. *Biochemistry* **38**:9508-9516.

**Jüttner F., Hentasch J. (1986).** Anoxic hypolomnon is a significant source of biogenic toluene. *Nature* **323**:797-798.

**Knappe J., Neugebauer F., Blaschowski H., Gänzler M. (1983).** Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Biochemistry* **81**:1332-1335.

**Knappe J., Neugebauer F., Blaschowski H., Gänzler M. (1984).** Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc.Natl. Acad. Sci USA* **81**:1332-1335.

**Krebs C., Broderick W., Henshaw T., Broderick J., Huynh B. (2001).** Coordination of Adensoylmethionine to a Unique Iron Site of the [4Fe-4S] of Pyruvate Formate-Lyase

---

Activating Enzyme: A Mössbauer Spectroscopic Study. *Journal of the American Chemical Society* **124**:912-913.

**Laemmli U. (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

**Laempe D. (1999).** Der zentrale anaerobe Benzoyl-CoA-Weg im denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica*. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br..

**Leuthner B., Heider J. (2000).** Anaerobic Toluene Catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* Operon Codes for Enzymes of  $\beta$ -Oxidation of the Intermediate Benzylsuccinate. *Journal of Bacteriology* **182**:272-277.

**Leuthner B. (1999).** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zum anaeroben Metabolismus von Toluol in dem denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica*. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br..

**Leutwein C., Heider J. (2002).** (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Arch. Microbiol.* **178**:517-524.

**Leutwein C., Heider J. (2001).** Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate-CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **183**:4288-4295.

**Leutwein C. (2000).** Biochemische Untersuchungen zum anaeroben Toluol-Stoffwechsel. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br..

**Leutwein C., Heider J. (1999).** Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and  $\beta$ -oxidation of the first intermediate (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology* **145**:3265-3271.

**Lovely D., Lonergan D. (1990).** Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism GS-15. *Appl. Env. Microbiol.* **56** :1858-1864.



**Lippard S., Berg J. (1994).** Principles of Bioinorganic Chemistry. *University Science Books*.

**Merki C. (1993).** Zucker gegen Saccharin. Zur Geschichte der künstlichen Süßstoffe. *Campus Verlag*.

**Miller J. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**Murray M., Thompson W. (1980).** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**:4321-4325.

**Neuwald A., Aravind L., Spouge J., Koonin E. (1999).** AAA<sup>+</sup>: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **1**: 27-43.

**O'Brien J., Raynaud C., Croux C., Girbal L., Soucaille P., Lanzilotta W. (2004).** Insight into the Mechanism of the B<sub>12</sub>-Independent Glycerol Dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary Biochemical and Structural Characterization. *Biochemistry* **43**:4635-4645.

**Padovani D., Thomas F., Trautwein A., Mulliez E., Fontecave M. (2001).** Activation of Class III Ribonucleotide Reductase from *E.coli*. The Electron Transfer from the Iron-Sulfur Center to *S*-Adenosylmethionine. *Journal of the American Chemical Society* **40**:6713-6719.

**Pfennig N. (1978).** *Rhodocyclus purpureus* gen. nov and sp. nov., a ring shaped, vitamin B<sub>12</sub>-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28** :283-288.

**Qiao C., Marsh E. (2005).** Mechanism of Benzylsuccinat Synthase: Stereochemistry of Toluene Addititon to Fumarate and Maleate. *Journal of the American Chemical Society* **127**:8608-8609.

**Rabus R., Widdel F. (1995).** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**:96-103.

**Raynaud C., Sarcabel P., Meynaial-Salles I., Croux C., Soucaille P. (2003).** Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Chlostridium butyricum*. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* **100**:5010-5015.

**Sambrook T., Frisch E., Maniatis J. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

**Schachter D., Taggart J. (1953).** Benzoyl Coenzyme A and Hippurate Synthesis. *J Biol Chem* **2**:925-934.

**Schlegel H. (1992).** Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage. *Thieme Verlag, Stuttgart*.

**Schulz H. (1996).** Reinigung der Benzylsuccinatsynthase, des ersten Enzyms im anaeroben Toluolstoffwechsel, aus dem denitrifizierenden Bakterium *Thauera aromatica*. Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

**Selmer T., Pierik A., Heider J. (2005).** New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic Steps in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* **386**: 981-988.

**Selmer T., Andrei P. (2001).** *p*-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. *Eur. J. Biochem.* **268**:1363-172.

**Seyfried B., Glod G., Schocher R., Tschech A., Zeyer J. (1994).** Initial Reactions in the Anaerobic Oxidation of Toluene and *m*-Xylene by Denitrifying Bacteria. *Applied and Enviromental Microbiology* **60**:4047-4052.

**Sofia H., Chen G., Hetzler B., Reyes-Spindola J., Miller N. (2001).** Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved Steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Research* **29**: 1097-1106.

**Stanier R., Ornston L. (1973).** The  $\beta$ -ketoadipate pathway. *Adv. Microbiol. Physiol.* **9**:89-151.

**Studier F., Moffat B. (1986).** Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* **189**:113-130.

**Tschech A., Fuchs G. (1987).** Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonas. *Arch. Microbiol.* **148**:213-217.

**U.S. Public Health Service (1989).** Toxicological profile for toluene. Agency for Toxic Substances and disease Registry, U.S. Public Health Service, Atlanta.

**Verfürth K. (2005).** Untersuchungen zur Reaktion der Benzylsuccinat Synthase, des ersten Enzyms des anaeroben Toluol-Stoffwechsels. Doktorarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br..

**Verfürth K., Pierik A., Leutwein C., Zorn S., Heider J. (2004).** Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and *m*-xylene metabolism. *Archives of Microbiology* **181**:155-162.

**Vogel T., Grbic-Galic D. (1986).** Incorporation of Oxygen from Water into Toluene and Benzene during Anaerobic Fermentative Transformation. *Applied and Environmental Microbiology* **52**: 200-202.

**Wagner A., Frey M., Neugebauer F., Schäfer W., Knappe J. (1991).** The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734. *Biochemistry* **89**:996-1000.

**Walsby C., Hong W., Broderick W., Cheek J., Ortillo D., Broderick J., Hoffmann B. (2001).** Electron-Nuclear Double Resonance Spectroscopic Evidence that S-Adenosylmethionine Binds in Contact with the Catalytically Active [4Fe-4S]<sup>+</sup> Cluster of Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme. *Journal of the American Chemical Society* **123**:3143-3151.

**Widdel F., Kohring G., Mayer F. (1983).** Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Charakterization of the filamentous gliding *Desulfonema*

*limicola* gen. nov. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov.. *Arch. Microbiol.* 134:286-294.

**Woodcock D., Crowther P., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S., Michael M., Graham M. (1989).** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acid Res.* **17**:3469-3478.

**Zehr B., Sahl T., Hall R. (1989).** A one-step, low background coomassie staining for polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **182**:157-159.

**Zengler K., Heider J., Rossello-Mora R., Widdel F. (1999).** Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdis*. *Arch Microbiol* **172**:204-212.

**Zeyer J., Kuhn E., Schwarzenbach R. (1986).** Rapid Microbial Mineralization of Toluene and 1,3-Dimethylbenzene in the Absence of Molecular Oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* **52**:944-947.

**Zylstra G., Gibson D. (1991).** Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. *Setlow J. K. (ed.) Genetic Engineering*, Plenum Press, New York, **13**:183-203.

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

---

Name	Carmen Feil
Geburtsdatum	2. Januar 1978
Geburtsort	Spaichingen
Familienstand	ledig, keine Kinder

### *Ausbildung*

---

1984-88	Dinkelberg-Grundschule in Minseln
1988-97	Georg-Büchner-Gymnasium Rheinfelden
1997	Abitur
1997-99	Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1999-2001	Hauptstudium der Biologie (Diplom) an der Albert-Ludwis-Universität Freiburg i. Br.
01/2002-10/2002	Diplomarbeit unter der Leitung von PD Dr. Josef Schneider (Institut für Virologie, Freiburg i. Br.) Thema "Untersuchungen zur Inhibition von HIV durch das Flavivirus GBV-C: Hinweise auf einen ursächlichen Serumfaktor"
seit 12/2002	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Johann Heider, Institut für Mikrobiologie und Genetik, TU Darmstadt Thema: "Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels von <i>Thauera aromatica</i> " Im Zeitraum von 12/2002 bis 07/2005 erfolgte die Arbeit an der Albert-Ludwis-Universität in Freiburg i. Br., danach an der TU Darmstadt.

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

(Datum)

---

(Unterschrift)

## Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer Professor Dr. J. Heider. Seine allgegenwärtige Hilfe, seine stetige Bereitschaft zur Diskussion und das Vertrauen, dass er mir entgegenbrachte, trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Herrn Professor Dr. G. Fuchs bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die hilfreiche Unterstützung während meiner „Freiburger Zeit“.

Bei Frau Professor Dr. F. Pfeifer und ihrer gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich herzlichst für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung, die uns nach dem Umzug nach Darmstadt entgegengebracht wurde.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fuchs für die angenehme Zusammenarbeit und die Unterstützung im Laboralltag.

Der Darmstädter Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Heider danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die nette Zusammenarbeit.

Prof. Dr. T. Friedrich (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg) danke ich für die Aufnahme der ESR-Spektren, für die Einführung in diese Technik und für die gute Zusammenarbeit.

Bei Daniel Klör aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Schulz (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg) möchte ich mich für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse bedanken.

Herrn Warth aus dem Arbeitskreis von Dr. Wörth (Institut für Organische Chemie und Biochemie) danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Muchas gracias para todo a mi mama, mi hermano Fabian y Micha!